

**MEMBRÁNOK LIPID- ÉS PIGMENTTARTALOM  
VÁLTOZÁSÁNAK ÉLETTANI HATÁSA  
CIANOBAKTÉRIUMOKBAN**

**Doktori (PhD) értekezés**

**Várkonyi Zsuzsanna**

**Témavezető: Dr. Gombos Zoltán  
a MTA doktora**

**MTA Szegedi Biológiai Központ  
Növénybiológiai Intézet**

**Szeged**

**2000**

## Tartalom

	oldal
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	
<b>1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>1</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>5</b>
<b>2.1. A cianobaktériumok</b>	<b>5</b>
2.1.1. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	7
2.1.2. <i>Synechocystis</i> PCC6803	9
<b>2.2. A cianobaktériumok lipid membránja</b>	<b>10</b>
2.2.1. A membránt felépítő lipidek zsírsav összetétele	11
2.2.2. A különböző lipidosztályok szerepe a tilakoid membrán- szerkezet és afotoszintetikus aktivitás fenntartásában	14
<b>2.3. A cianobaktériumok karotinoid összetétele</b>	<b>17</b>
2.3.1. A karotinoidok szerepe a fotoszintetizáló szervezetekben	17
2.3.2. A cianobaktériumokban található karotinoidok membrán szerkezetet befolyásoló szerepe	20
<b>2.4. A cianobaktériumok fotoszintézise, fényátlás</b>	<b>23</b>
2.4.1. A cianobakteriális elektrontranszportlánc komponensei	23
2.4.2. A fényátlás	26
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER</b>	<b>29</b>
<b>3.1. A felhasznált cianobaktérium törzsek tenyésztési körülményei</b>	<b>29</b>
3.1.1. <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	29
3.1.2. <i>Synechocystis</i> <i>pgsA</i> <sup>-</sup> (PG hiányos) mutáns	29
3.1.3. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	29
<b>3.2. A sejtmembránok izolálása</b>	<b>30</b>
<b>3.3. Lipid és zsírsav analízis</b>	<b>31</b>
3.3.1. Lipid extrakció és elválasztás	31
3.3.2. Zsírsavanalízis	31

3.4. Karotinoidok elválasztása	31
3.5. Fotoszintetikus elektrontranszport aktivitások mérése	32
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	34
4.1. A <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> sejtek szaporodásának vizsgálata	34
4.2. Fotoszintetikus aktivitás – elektrontranszport	36
4.3. Membrán lipid vizsgálatok – zsírsavanalízis	38
4.3.1. A <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> sejtek lipid összetétele	38
4.3.2. A nevelési hőmérséklet hatása a <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> és <i>Synechocystis</i> PCC6803 sejtek zsírsav összetételére	38
4.4. A <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> karotinoid összetétele	42
4.5. A <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> alacsony-hőmérsékletű fotoinhibíciója	49
4.6. A foszfatidilglicerol szerepe az elektrontranszport folyamatában	55
4.6.1. <i>pgsA</i> mutáns <i>Synechocystis</i> PCC6803 előállítása	55
4.4.2. A PG tartalom változása	55
4.4.3. A PG szint csökkenésének hatása a PSI aktivitására	56
4.4.4. Mesterséges kinonok hatása a fotoszintetikus oxigén fejlődésre	57
4.4.5. A PS II aktivitás mérése fluoreszcencia indukcióval	58
4.4.5. A fotoszintetikus elektrontranszport jellemzése termolumineszcencia mérések segítségével	60
5. ÖSSZEFOGLALÁS	63
SUMMARY	66
A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS KÖZLEMÉNYEK	72
FELHASZNÁLT IRODALOM	75
KÖSZÖNET	81

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP	adenozin-trifoszfát
B-sáv	S <sub>2</sub> - Q <sub>B</sub> - töltésrekombinációból eredő TL sáv
CM	citoplazmás membrán
D1 és D2	a PSII reakció centrum heterodimer fehérje alkotói
DBI	kettős kötés index
DCMU	3-(3,4-diklór-fenil)-1,1-dimetil-karbamid
<i>desA</i> , <i>desD</i>	a $\Delta 12$ , ill. a $\Delta 6$ deszaturáz enzimeket kódoló gének
DGDG	digalaktozil-diacilglicerol
DMBQ	dimetil-benzokinon
Fd	ferredoxin
F <sub>m</sub>	maximális fluoreszcencia
F <sub>o</sub>	kezdeti fluoreszcencia
F <sub>v</sub>	változó fluoreszcencia
FTIR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia
HPLC	nagy felbontású folyadék kromatográf
MGDG	monogalaktozil-diacilglicerol
NADPH	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát
OD	optikai denzitás
P680	a PSII reakciócentruma
P700	a PSI reakciócentruma
PC	plasztocianin
PG	foszfatidilglicerol
<i>pgsA</i>	foszfatidilglicerolfoszfát szintetáz enzimet kódoló gén
<i>psbA</i>	a D1 fehérjét kódoló gén
Pheo	feofitin
PBQ	para-benzokinon



<b>PQ</b>	<b>plasztokinon</b>
<b>PSI</b>	<b>első fotokémiai rendszer</b>
<b>PSII</b>	<b>második fotokémiai rendszer</b>
<b>Q sáv</b>	<b>S<sub>2</sub>-Q<sub>A</sub>- töltésrekombinációból eredő TL sáv</b>
<b>Q<sub>A</sub></b>	<b>a PSII elsődleges kinon akceptora</b>
<b>Q<sub>B</sub></b>	<b>a PSII másodlagos kinon akceptora</b>
<b>SQDG</b>	<b>szulfoquinovozil-diacilglicerol</b>
<b>TL</b>	<b>termolumineszcencia</b>
<b>TM</b>	<b>tilakoid membrán</b>
<b>UV</b>	<b>ultraibolya</b>
<b>Z</b>	<b>tirozin oldallánc a PSII reakció centrumban a D1 fehérjén</b>

## **1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK**

A fotoszintetikus szervezetek számára a fény és a hőmérséklet az őket körülvevő környezeti faktorok között meghatározó szerepet töltenek be. Ezek a szervezetek a környezet állandó változásaira alkalmazkodással válaszolnak. Az alkalmazkodás lényege a környezetnek megfelelő optimális anyagcserefolyamatok beállítása. A fotoszintézis szolgáltatja az ilyen szervezetek számára a biokémiai folyamatokban felhasználható makroerg kötést tartalmazó, energiahordozó molekulákat (ATP) és a redukált koenzimeket (pl. NADH, NADPH). A fotoszintetikus folyamatok döntő többsége a sejtek belső terében megtalálható membránokba ágyazott fehérjékhez kötve játszódik le. Ezért a membránok szerkezete nagy mértékben befolyásolhatja a fotoszintézis folyamatait. Ahhoz, hogy a sejtek az esetleges környezeti változásokat széles határok között tolerálni tudják - a membránokhoz kötött folyamatok lehetőség szerinti azonos, optimális szinten tartása érdekében - a membránszerkezeteknek megfelelően plasztikusnak kell lenniük. Az alkalmazkodás során a membránoknak mind a lipid, mind a fehérje és pigment összetétele módosul. Gazdasági szempontból is igen fontos a növények különböző hőmérsékletekhez és fényintenzitásokhoz történő alkalmazkodási képességeinek megértése.

Munkámhoz egy olyan kísérleti rendszert választottam, mely - a dolgozatomban részletezett, a kísérletek kivitelezése szempontjából lényeges előnyökön túl -

környezetbiológiai jelentőséggel is bír. Vizsgálataim egy részét a Balatonban előforduló toxin termelésre képes kéalgán, a *Cylindrospermopsis raciborskii*-n végeztem.

A Balaton ökológiai állapotának védelme és a vízminőség javításának igénye több mint három évtizede került előtérbe. A tó veszélyeztetettségét, ökológiai állapotának romlását számos kedvezőtlen folyamat megjelenése is jelezte. Ezek között leginkább aggasztó az egysejtű növényi szervezetek, az algák, cianobaktériumok rendkívüli elszaporodása volt. A toxintermelésre is képes cianobaktériumok jelenléte és az algavirágzások korábban évenkénti, szezonális megismétlődése miatt indokolt az igény, hogy elvégezzük a balatoni algák élettani jellemzését. E célt szem előtt tartva vizsgáltam a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek fotoszintetikus tulajdonságait. Különös figyelmet fordítottam a tilakoid membránok hőmérsékleti- és fényadaptációs sajátosságaira, ami magyarázattal szolgálhat arra a tényre, hogy miért éppen ez a cianobaktérium szelektálódott ki és okozta a legnagyobb algavirágzásokat a Balatonban.

A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek fiziológiai jellemzőit összevetettem a magasabbrendű növények fotoszintézisének modelljeként is használatos és részletesen tanulmányozott *Synechocystis* PCC6803 sejtek tulajdonságaival.

A további kísérletekben a cianobaktériumok fotoszintetikus membránjaiban található lipidek közül az eddig még *in vivo* körülmények közt nem tanulmányozott foszfatidilglicerol szerepét vizsgáltam a fotoszintetikus elektrontranszportban. Ehhez a *Synechocystis* sp. PCC6803 egysejtű cianobaktérium egy olyan mutánsát használtuk, amelyben inaktiváltuk a foszfatidilglicerolfoszfát szintetáz enzimet kódoló *pgsA* gént. Az így előállított mutáns foszfatidilglicerol auxotrófnak bizonyult. Ezekben a mutánsokban a külső foszfatidilglicerol koncentráció változtatásával

lehetőségünk nyílt a sejten belüli foszfatidilglicerol szint széles határok közötti változtatására. Ez a kísérleti elrendezés lehetőséget nyújtott arra, hogy az egyéb sejtalkotók változatlanul hagyása mellett ennek a lipidnek az élettani jelentőségét tanulmányozhassuk.

Vizsgálatainkban célul tűztük ki, hogy:

- (i) megvizsgáljuk a természetes körülmények között is előforduló alacsony és magas fényintenzitások és hőmérsékletek hatását a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek szaporodására;
- (ii) a *C. raciborskii* sejtek membránjai lipid összetételének változását analizáljuk a különböző környezeti paraméterek, mint pl. hőmérséklet, fényintenzitás változtatásának hatására, és a sejtek élettani vizsgálatával nyerünk újabb ismereteket a megváltozott membránszerkezet jelentőségéről a szélsőséges fényintenzitással és hőmérséklettel szembeni tolerancia kialakításában;
- (iii) megmérjük az alacsony hőmérséklet és a nagy fényintenzitás hatására, a stresszhez történő alkalmazkodás során bekövetkező karotinoid tartalom változását a *C. raciborskii* sejtől izolált tilakoid membránokban, a xantofillok membránszerkezetet befolyásoló szerepének felderítése céljából a korábban csak *in vitro* rendszeren tanulmányozott szerep vizsgálatát izolált fotoszintetikus membránokon is elvégezzük;
- (iv) összehasonlítsuk a *C. raciborskii* sejtek fotoszintézisének alacsony hőmérsékletű fénygátlását a magasabbrendű növények fotoszintézis modelljeként használatos *Synechocystis* PCC6803 sejtek fotoinhibíciójával és

vizsgáljuk a két cianobaktérium fotoszintetikus aktivitásának helyreállítását fotoinhibíció után;

- (v) meghatározzuk a foszfatidilglicerol szerepét a cianobaktériumok tilakoid membránjában és a két fotokémiai rendszer aktivitásában a rendelkezésünkre álló *Synechocystis* PCC6803 *PsgA*<sup>-</sup> mutánsok segítségével.

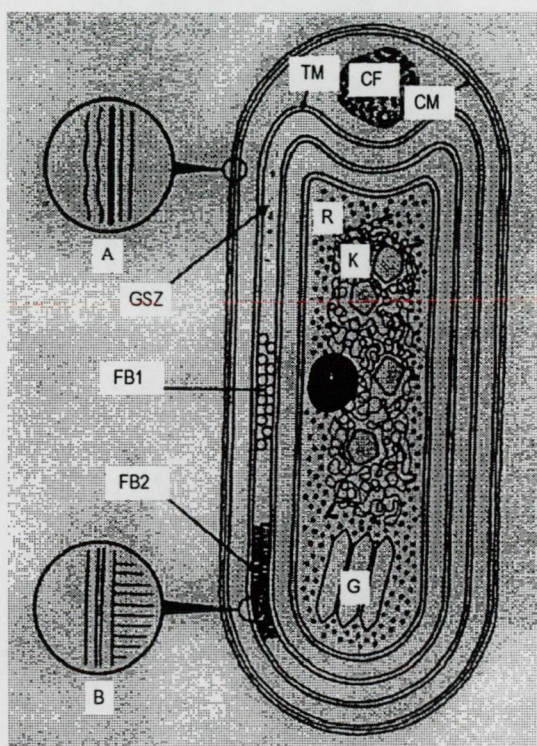
## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A cianobaktériumok

A cianobaktériumok eredete visszavezethető a földi élet kezdeteire. Ezen organizmusok maradványai a több mint 3 milliárd éves földrétegekben is megtalálhatók. A cianobaktériumok olyan mikroorganizmusok, melyek bár tipikus prokarióta szervezetek, fotoszintetikus apparátusuk, - struktúrájukat és funkciójukat tekintve, - a fototróf eukarióták kloroplasztiszainak fotoszintetikus apparátusához hasonlítanak (Stanier és Cohen-Bazire, 1977).

A növénybiológia fejlődésében történelmi mérföldkönek tekinthető Schrimper felvetése 1883-ban, miszerint a növényi sejtek autonóm zöld sejtek és szintelen gazdasejtek endoszimbiózisának az eredményei (Schrimper, 1883). A hipotézis fejlődését követve Mereschowsky nevét kell megemlítenünk, aki 1910-ben elsőnek írta le, hogy a cianobaktériumok a fotoszintetizáló eukarióta sejtek plasztiszainak lehetséges elődjai (Mereschowsky, 1910). Mára ez a feltételezés elfogadott tény, hiszen összehasonlították a cianobaktériumokban található génklusztereknek az elrendeződését a fotoszintetizáló eukarióták plasztiszainak a genomjával és közös eredetük igazolódott, bár még vannak vitatott kérdések az endoszimbiotikus események értelmezése körül (Martin és mtsai, 1992). Abban teljes az egyetértés, hogy a cianobaktériumok a magasabbrendű növények fotoszintézis modelljeként használhatóak, mivel bennük is megtalálható a tilakoid membrán, a plazmamembrán és a külső membrán, épp úgy, mint a magasabbrendű növények kloroplasztiszában a tilakoid- és a kettős burkolómembrán (Murata és Omata, 1988).

A cianobatóriumok elektronmikroszkópos felvételek alapján készült keresztmetszeti képét az 1. ábra mutatja be. A sejt protoplazmája több rétegű sejtfallal van körülvéve, mint a legtöbb gramm-negatív baktérium. A sejtfa egy külső membránból és egy 5-10 nm, változó vastagságú peptidoglükán rétegből áll. A külvilág felé a citoplazmás membrán, más néven plazmamembrán határolja a plazmát. A tilakoid membránok koncentrikus körökben futnak, és köztük kb. 60-70 nm membránközi tér van.



1. ábra: Cianobatóriumok vázlatos keresztmetszeti képe elektronmikroszkópos felvétel alapján (Stainer és Cohen-Bazire, 1977 nyomán)

**TM** tilakoid membrán, **B** tilakoid membrán kinagyítva **CM** citoplazmás membrán, **A** citoplazmás membrán kinagyítva, **FB1** és **FB2** a tilakoid membránhoz kapcsolódó fikobiliszómák szemből és oldalról nézve, **CF** cianoficin szemcse, **R** riboszóma, **K** nukleoplazmával körülvett karboxiszóma, **P** polifoszfát szemcse, **G** gáz vezikula, **GSZ** glikogén szemcse.

A membránba ágyazva találhatók a klorofill-a tartalmú antenna protein komplexek, a fotoszintetikus reakciócentrumok és az elektrontranszport-lánc elemei, továbbá a

membránok felszínéhez kötve helyezkednek el a "külső" fénybegyűjtő komplexek, a fikobiliszómák (részletesebben a 3. ábrán).

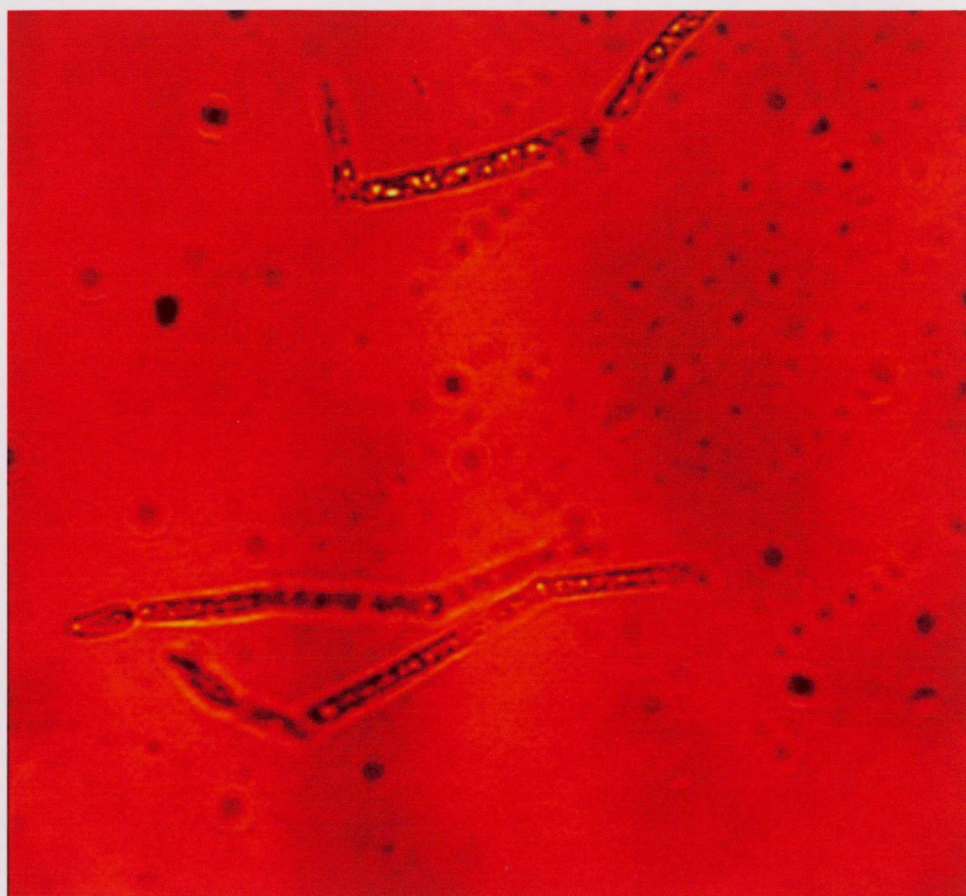
### 2.1.1. *Cylindrospermopsis raciborskii*

A *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju egy nitrogén fixáló, toxint - cylindrospermopsint – termelő (Hawkins és mtsai, 1985) heterocisztával rendelkező, fonalas cianobaktérium (süveges kékoszat), mely szubtrópusi és trópusi vizekben fordul elő nagy mennyiségben. A *Cylindrospermopsis raciborskii*-t Jáván, Indonéziában egy kis lagunából izolálta Raciborski, és Woloszynska sorolta be az *Anabaena* nemzetség egy új szekciójába, amelyet *Anabaenopsis*-nak nevezett el (Woloszynska, 1912). A *Cylindrospermopsis* nemzetséget az *Anabaenopsis* nemzetségtől Seenayya és Subba Raju különítette el 1972-ben a sejtek eltérő morfológiája és heterociszta képző tulajdonsága alapján. A faj a magyar flórában 1973-ig nem volt kimutatható. A trópusokról induló szárazföldi elterjedése tudományosan dokumentálható módon indomaláj területekről Közép-Ázsián át Közép-Európába az utóbbi néhány évben ment végbe és folytatódik Nyugat- és Észak-Európa vizei felé. A Balatonba feltételezések szerint vándormadarak jutatták el (Padisák, 1997).

A *Cylindrospermopsis raciborskii*-nak két különböző megjelenési formáját írták le, az egyik egyenes, míg a másik feltekeredett filamentumokat tartalmaz. A két morfológiailag különböző típus a 16S rRNS-ük szekvenálásával végzett vizsgálatban 99,8%-ban azonosnak adódott (Saker és mtsai, 1999). Az általunk vizsgált törzs, a Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* ACC9051 egyenes fonalú cianobaktérium, mint ahogy az a 2. ábrán látható.



Megjelenésének következményeként a hirtelen felmelegedések idején megemelkedik a toxin koncentráció a vízben, ami a környező élővilágot károsítja, és az embereknél is komoly tüneteket okoz. A Balatonban eddig három, az egész tóra kiterjedő vízvirágzás okozója volt a *Cylindrospermopsis raciborskii*. Az első 1982-ben zajlott le, melyet 1992-ben és 1994-ben még kettő követett.



2. ábra: A Balatonból izolált *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek lézersugár pásztázó-mikroszkópos felvétele. A transzmissziós módban készült képet Jávorfí Tamás készítette.

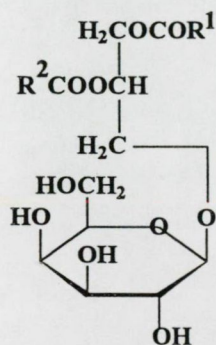
### 2.1.2. *Synechocystis* PCC 6803

A *Synechocystis* PCC 6803 egysejtű cianobaktérium törzs, molekuláris biológiai munkákra ideális. Felhasználása mellett szól az a tény, hogy a *Synechocystis* PCC 6803 törzs teljes génszekvenciája ismert (Kaneko és mtsai, 1996). Homológ rekombinációra képesek, sejtjei egyszerű módszerekkel, jól transzformálhatóak, így a legkülönbözőbb génmanipulációk is végrehajthatók rajta. Ez az a törzs amit a magasabbrendű növények fotoszintézisének modelljeként is használnak. A törzs *pgsA* mutánsát a későbbi fejezetekben részletesen bemutatom.

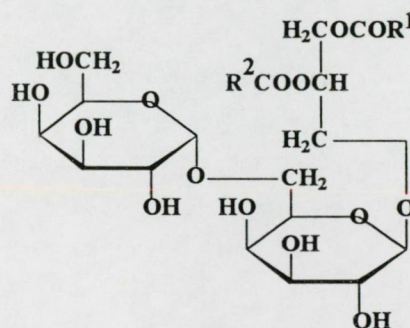


## 2.2. A cianobaktériumok lipid membránjai

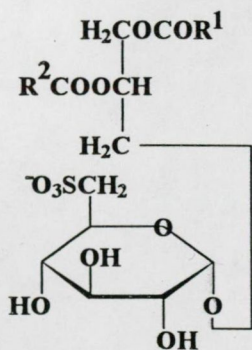
A cianobaktériumok lipid membránjai négy fő glicerolipid komponenst tartalmaznak, melyek szerkezeti képlete a 3. ábrán látható. Ez a négy lipid: a töltéssel nem rendelkező monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG) és digalaktozil-diacilglicerol (DGDG), valamint a negatív töltésű szulfoquinovozil-diacilglicerol (SQDG) és foszfátidil-diacilglicerol (PG).



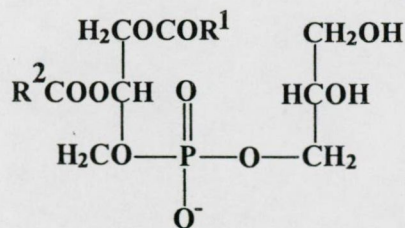
monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG)



digalaktozil-diacilglicerol (DGDG)



szulfoquinovozil-diacilglicerol (SQDG)



foszfátidil-diacilglicerol (PG)

3. ábra: A cianobaktériális membrán fő glicerolipidjeinek szerkezeti képlete. Az  $R^1$  és  $R^2$  a glicerol hidroxil csoportját észterestítő zsírsavakat jelentik. (Részletes magyarázat a szövegben és a 4. ábrán.)

Az MGDG az összlipid tartalom 50-60 %-át teszi ki, míg a DGDG, SQDG és a PG 10-20 %-át adják a glicerolipideknek. Vannak olyan cianobaktériumok amelyekben a galaktolipidek szintézisének egyik intermediere a monoglikozil-diacilglicerol (GlcDG) is megtalálható, de ez a glicerolipideknek csak 1-2 %-át teszi ki (Sato és Murata, 1982). A fő glicerolipidek a magasabbrendű növények kloroplasztisz membránjainak is fő alkotórészei.

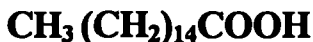
### 2.2.1. A membránt felépítő lipidek zsírsav összetétele

A cianobaktériumokat a membránlipideikben a glicerolt észteresítő zsírsavak (4. ábra) és azok bioszintézisének útja alapján Kenyon négy nagy csoportra osztotta (Kenyon, 1972, Kenyon és mtsai, 1972). Az általa felállított rendszer első csoportjába azok a fajok sorolhatók, amelyekben a telített zsírsavak mellett az egy kettőskötést tartalmazó zsírsavak észteresítik a glicerolt, míg a másik három csoportban többszörösen telítetlen zsírsavak is jelen vannak. A második csoportban a három kettős kötést tartalmazó - 18:3 (9,12,15) – zsírsav található meg, a harmadik csoportban a 18:3 (6,9,12) zsírsav mutatható ki, míg a negyedik csoportban az előbb említett zsírsavakon kívül még a 18:4 (6,9,12,15) zsírsav is szintetizálódik. A *Synechocystis* PCC6803 törzs a negyedik csoportba tartozik (Kenyon és mtsai, 1972, Oren és mtsai, 1985, Murata és mtsai, 1992).

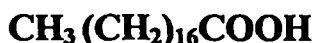
A cianobaktériumokban a zsírsav deszaturázok közül csak az acil-lipid deszaturázok találhatók meg, amelyek a glicerinvázat észteresítő zsírsavakon hoznak létre kettős kötések. A negyedik csoportba tartozó cianobaktériumokban, négy deszaturáz enzim alakítja ki a kettős kötések, melyeket a *desA*, *desB*, *desC* és *desD*

gének kódolnak és melyek a  $\Delta 12$ ,  $\Delta 15$ ,  $\Delta 9$  és  $\Delta 6$ -os pozícióban hoznak létre kettős kötéseket.

**Telített zsírsavak:**



PALMITIN SAV (hexadekán sav, 16:0)



SZTEARIN SAV (oktadekán sav, 18:0)

**Telítetlen zsírsavak:**  $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_5 \text{CH}=\text{CH} (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$

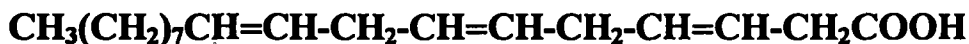
PALMITOILSAV (cisz 9 hexadekén sav, 16:1(cis 9))



OLAJSAV (cisz 9 oktadekén sav, 18:1(cis 9))



LINOLSAV (cisz, cisz 9, 12 oktadekadién sav, 18:2(cis,cis 9,12))



$\alpha$ -LINOLÉNSAV (cisz 9,12,15 oktadekatrién sav, 18:3(cis 9,12,15))



$\gamma$ -LINOLÉNSAV (cisz 6,9,12 oktadekatrién sav, 18:3 (cis 6,9,12))



OKTADEKATETRAÉN SAV (cisz 6,9,12,15 oktadekatetraén sav, 18:4 (cis 6,9,12,15))

4. ábra: A cianobaktériumok membránjában a glicerolipideket észteresítő zsírsavak

A lipid membrán annál rendezettebb, minél magasabb benne a telített zsírsavak aránya a telítetlenekéhez képest, és minél hosszabbak a zsírsavláncok. A telítetlen zsírsavak alakja hajlott pálcára emlékeztet, így a zsírsavláncok szoros egymás mellé rendeződése gátolt. A lánchosszúság a zsírsavláncok között kialakuló lipofil kölcsönhatásokon keresztül hat: minél hosszabb a lánc, annál erősebb a kialakuló kölcsönhatás és annál nagyobb fokú a membrán rendezettsége.



A zsírsavak pozicionális meghatározását több cianobaktérium törzsben elvégezték *Rhizopus delemar* fajból nyert lipáz enzim segítségével, mely specifikusan az sn-1 pozícióban lévő észterkötést hidrolizálja (Fischer és mtsai, 1973). Pozicionális megoszlásuk szerint a cianobaktériumokban az sn-2 helyen minden lipidosztályban 16 szénatom számú zsírsav található (Murata és mtsai, 1992).

Az a kérdés, hogy a zsírsav telítetlenség befolyásolja-e a növények szélsőséges hőmérsékletekkel szembeni ellenállóképességét, már évtizedekkel ezelőtt is intenzív kutatás tárgyát képezte. A legkülönbözőbb szervezetekben a külső környezet hőmérséklet csökkenése együtt jár a zsírsav telítetlenség növekedésével (Thompson, 1980). Ezt a változást azonban számos metabolikus változás kísérte. Ez lehetetlenné tette a zsírsavak szerepének egyértelmű tisztázását (Cooper és Ort, 1988, Guy és mtsai, 1985, Mohapatra és mtsai, 1987).

Raison (1973) és Lyons (1973) feltételezték hogy a lipidek fázisátalakulásai meghatározó szerepet tölt be az élő szervezetek hidegérzékenységében. Az elmélet szerint a hidegérzékeny növények membrán lipidjei alacsony, de fagypont feletti hőmérsékleten gél fázisba kerülnek, míg a hidegtűrő növények lipidjei folyadékkristályos állapotban maradnak. A membrán lipidek fizikai állapota a lipidek fejcsoportjától, a glicerint észteresítő zsírsavak hosszától és ezeknek a zsírsavaknak a telítetlenségétől függ. Ezt az elméletet cianobaktérium sejtekkel végzett kísérletekkel bizonyították (Ono és Murata, 1981). A cianobaktériumok a magasabbrendű növények laboratóriumi körülmények között könnyen kezelhető modelljeként szolgálnak. Mivel a sejtek könnyen transzformálhatók, ezért zsírsavösszetételük a deszaturáz enzimek mutációjával jól szabályozható (részletek a 2.4. fejezetben). A különböző nevelési hőmérsékleteken a

membránokban megjelenő eltérő zsírsavösszetétel része annak a regulációs folyamatnak, amely lehetővé teszi az organizmusok számára a külső környezethez való adaptációt azáltal, hogy a membránjainak fluiditását optimális körülmények között tartja fenn (Murata és mtsai, 1984).

A membrán lipidekben a zsírsavak telítettségének szabályozása különböző módokon történhet. A zsírsav deszaturáz enzimek aktivitása magasabb hőmérsékleten kisebb, mint alacsonyabb hőmérsékleten (Horváth és mtsai, 1991). Alacsony hőmérsékleten a telített zsírsavak *de novo* szintézise is kisebb mértékű. A kevesebb újonnan szintetizálódott telített zsírsav mellett a deszaturáció sebessége nem változik, ennek következményeként a telítetlen/telített zsírsavak aránya nő. Az alacsonyabb hőmérséklet a deszaturáz enzimek szintézisét indukálja (Wada és Murata, 1990, Los és mtsai, 1993).

#### 2.2.2. A különböző lipidosztályok szerepe a tilakoid membránszerkezet és a fotoszintetikus aktivitás fenntartásában

A membránok általános, ismert funkciói mellett a magasabbrendű növények, algák és a cianobaktériumok tilakoid membránjai speciális funkciót is ellátnak, beágyazzák a fényhasznosításban résztvevő komplexeket és biztosítják működési feltételeiket. A tilakoid membránok glicerolipidekből, a fotoszintetikus elektrontranszportban résztvevő fehérje komplexekből és az energia konverzióban is szerepet játszó pigment-protein komplexekből épülnek fel. A glicerolipidek szerepét a fotoszintetizáló tilakoid membránban *in vitro* és *in vivo* is tanulmányozták (Siegenthaler, 1998). Güler és mtsai. (1996) olyan *Synechococcus* sp. PCC7942 mutánst állítottak elő, mely nem tartalmazott SQDG-t. Ennek vizsgálatával kimutatták, hogy ennek a lipid

komponensnek a teljes hiánya – egyébként optimális feltételek mellett - nem befolyásolta a cianobaktérium sejtek szaporodását és fotoszintézisét.

Dörmann és munkatársai (1995) DGDG hiányos *Arabidopsis thaliana* mutánst izoláltak. A növény fejlődése lassú volt, a levelei halványak voltak, a fotoszintetikus aktivitása csökkent és a tilakoid membránok ultrastruktúrája megváltozott. Ezek az eredmények azt mutatták hogy a DGDG fontos szerepet játszik a tilakoid membrán szerkezetének fenntartásában és ezen keresztül a fotoszintézisben. MGDG és PG hiányos mutánsokat még nem vizsgáltak, így ennek a két lipidnek az *in vivo* szerepe ez ideig nem teljesen tisztázott a membránszerkezet fenntartásában és a fotoszintézisben.

A negatív töltésű lipidek, mint amilyen a PG, könnyen képesek kötődni a fotoszintetikus apparátus protein komplexeinek speciális szegmenseihez, módosítva ezáltal annak szerkezetét és működését.

Murata és munkatársai mutatták ki a növények kloroplasztiszaiban mért telített és az egyszeresen telítetlen foszfatidilglicerol tartalom és a növények hidegérzékenysége közötti közvetlen kapcsolatot (Murata, 1983; Murata és mtsai, 1982). Ezeknek a lipid molekuláknak folyadékkristályosból a gél fázisba való átalakulása a fiziológiás hőmérséklet tartományban történik. A hidegérzékenység és a foszfatidil-glicerol tartalom közötti kapcsolat több növény esetében is egyértelműen kimutatható volt (Bishop, 1986; Tasaka és mtsai, 1990). Ezek a megfigyelések aláhúzzák a PG bioszintézis jelentőségét a növények hidegérzékenységének kialakulásában.

Kruse és mtsai. (1994) *in vitro* kísérleteket végeztek *Oscillatoria chalybae* izolált tilakoid membránjával olyan ellenanyaggal, amelyet PG ellen termeltettek azért, hogy megvizsgálják a PG specifikus kötődésének a helyét a fotoszintetikus apparátus



protein komplexeihez. Azt találták, hogy a PG molekulák szorosan kötődnek a D1 fehérje egyik hidrofób részéhez. Feltételezik, hogy a PG fontos szerepet játszik a D1 protein orientációjának és a komplexben való rögzítésében. Foszfolipáz A2 kezelés után megállapítható volt, hogy a PG a PSII komplex heterodimer formálásához nélkülözhetetlen. Ezek az *in vitro* kísérletek azonban nem szolgáltathatnak közvetlen bizonyítékot a PG fotoszintézisben betöltött szerepére, hiszen nem kizárt, hogy az enzimatis kezelések műtermékeket, nem-specifikus hatásokat hozott létre.

H. Wada laboratóriumában létrehoztak egy olyan *Synechocystis* sp. PCC6803 mutánst, melyben inszerciós mutációval inaktiválták a *pgsA* gént - mely a PG foszfát szintáz enzimet kódolja (Hagio és mtsai, 2000). Az így előállított PG szintézisre képtelen mutáns letális. Kihasználva azt a lehetőséget, hogy a PG-t a *Synechocystis* sejtek szabadon felveszik a környezetből, a mutáns sejteket a médiumhoz adott PG jelenlétében neveltük. A PG-nak a sejtekhez történő adagolásával a sejten belüli PG szintet széles határok között lehet beállítani, így módon lehetőségünk nyílt a PG fiziológiás szerepének meghatározására és speciális hatásainak vizsgálatára.

### 2.3. A cianobaktériumok karotinoid összetétele

A karotinoidok alkotják a természetben előforduló pigmentek legnagyobb csoportját – máig több mint 640 karotinoidot azonosítottak.

Minden fotoszintetizáló szervezet állít elő karotinoidokat, de nem fotoszintetizáló baktériumok, gombák, sőt az állatok közül is sok képes a szintézisükre.

A legtöbb karotinoidot  $C_{40}$ -es szénhidrogén váz alkotja, mely nyolc  $C_5$ -ös izoprenoid egységből épül fel és konjugált kettős kötések tartalmaz. A karotinokban nincs oxigén atom, de jellemző rájuk a lineáris molekula egyik, vagy mindkét végén megtalálható gyűrű. A xantofillok a karotinok oxigén tartalmú származékai. Több glükózilált karotinoidot és karotinoid észtert is azonosítottak (Goodwin és Britton, 1988).

#### 2.3.1. A karotinoidok szerepe a fotoszintetizáló szervezetekben

A fotoszintetizáló szervezetek karotinoid pigmentjei több funkciót látnak el, melyek közül a legfontosabb a fény „begyűjtése”, a fotooxidatív károsító hatások kivédése (Fujimori és Livingston, 1957, Palozza és Krinsky, 1992) és a pigment-protein komplexek szerkezetének stabilizálása (Plumley és Schmidt, 1987, Paulsen és mtsai, 1990).

Mint a fénybegyűjtő antenna alkotói, a karotinoidok képesek a fotonok abszorpciójára – 450 és 570 nm között – és a felvett energia átadására a klorofill molekuláknak (Cogdell és Gardiner, 1993).

A karotinoidok a fénybegyűjtő antennák pigment-protein komplexeinek integráns építő elemei, de fontos szerepet töltenek be a reakciócentrumokban is. Egy termofil

cianobaktérium fotokémiaailag aktív klorofill–protein komplexében található karotinoidok lineáris dikroizmus spektroszkópai vizsgálatával próbálták felderíteni a fixált mintában a karotinoidok pontos elhelyezkedését (Breton és Kato, 1987). Ezek a komplexek főleg  $\beta$ -karotint tartalmaztak, melyek 505 és 470 nm között abszorbeálnak fényt és a membrán síkjával párhuzamosan helyezkednek el. Fotokémiaailag inaktív komplexben a  $\beta$ -karotin 495 és 465 nm-nél abszorbeál és a molekulák a membrán síkjára merőlegesen helyezkednek el.

Azt, hogy a karotinoidok a cianobaktériumok PSII komplexével asszociáltak 1977-ben írták le (Suzuki és Fujita). A reakciócentrum „magjában” két  $\beta$ -karotin molekulát találhatunk (Newell és mtsai, 1993), de ezek pontos funkciója a mai napig sem tisztázott (Sato, 1992). Izolált PSII reakciócentrumokon kimutatták, hogy ez a két  $\beta$ -karotin molekula védi a P680 klorofillt a károsító hatástól (De Las Rivas és mtsai, 1993), és feltételezik, hogy a  $D_1$  alegység degradációjának megakadályozásában játszik fontos szerepet (Sandmann és mtsai, 1993).

*Synechococcus* PCC6301 törzsből izolált PSI reakciócentrum, amelyben kb.  $130 \pm 5$  molekula antenna klorofillt tartalmaz egy P700-ra vonatkoztatva – 16 molekula karotinoidot találtak (Lundell és mtsai, 1985). A  $\beta$ -karotin a PSI fő polipeptidjéhez kötődik és hatásos antennaként működik.

A karotinoidok a nagy fényintenzitás ellen védő pigmentként is szolgálnak a növényekben. A karotinoidok felhalmozódása szintén megfigyelhető volt a cianobaktérium sejtekben, ha azok nagy fényintenzitásnak voltak kitéve. Ezek a molekulák képesek megvédeni a fotoszintetikus apparátust a fotooxidációs folyamatoktól, amelyeket a gerjesztett triplett állapotú klorofill molekulák okozhatnak.

A cianobaktériumokban található karotinoid molekulákban a kilenc konjugált kettős kötés  $\pi$  elektronjai képesek a triplett gerjesztési állapotban lévő klorofill molekulák energiáját átvenni, és így megakadályozni a veszélyes szingulett állapotú oxigén gyökök kialakulását (Demmig-Adams, 1990).

Algákban és magasabbrendű növényekben a violaxantin fény indukálta deepoxidációja, melynek eredménye a zeaxantin, szintén a fotoprotekciót szolgálja. Ez a folyamat a sötétben lejátszódó ellenkező irányban történő reakcióval együtt xantofill ciklus néven ismert (Stransky és Hager, 1970; Yamamoto, 1979; Demmig-Adams és Adams, 1992). A cianobaktériumokban nincs jelen a xantofill ciklus, de a legtöbb törzsben megtalálhatjuk a zeaxantint, vagy más xantofillt – bár néha csak nyomnyi mennyiségben – ami a klorofill fotoprotekcióját képes ellátni.

A xantofillok védik a fotoszintetikus membránban található nagymértékben telítetlen zsírsavakat is a peroxidációval szemben, amellet a védelem mellett, amit a szingulett gerjesztett állapotban lévő klorofill molekulák kioltásával nyújtanak (Havaux, 1998; Havaux és Niyogi, 1999).

Számos más funkciót is ellátnak a karotinoid molekulák. UV rezisztens mutáns *Gloeocapsa alpicola* cianobaktérium sejtekben kimutatták a karotin molekulák felhalmozódását (Buckley és Houghton, 1976). Később bebizonyították, hogy a  $\beta$ -karotin jelenléte - hatásos oxigén gyök befogóként működve (antioxidáns tulajdonságának köszönhetően) – minden típusú sejtet megvéd az UV sugárzással szemben (Tuveson és Sandmann, 1993).

### *2.3.2. A cianobaktériumokban található karotinoidok membrán szerkezetet befolyásoló szerepe*

A cianobaktériumok a magasabbrendű növényekben megtalálható karotinoidokat szintetizálják, de található közöttük néhány különleges xantofill molekulát előállító törzs is. A legáltalánosabban megtalálható karotinoidok a cianobaktériumokban a  $\beta$ -karotin (Hertzberg és Liaaen-Jensen, 1971) (8. ábra), a zeaxantin, a ketokarotinoid echinenon (7. ábra) és a karotinoid-glükozid myxoxantofill (Goodwin, 1980) (6. ábra). Mivel a cianobaktériumok karotinoid összetétele könnyen áttekinthető, ezért jó modellként szolgálnak a karotin bioszintézis tanulmányozásához illetve e pigmentek élettani szerepének a tisztázásához (Goodwin, 1993).

A jelenlegi általános felfogás szerint a fiziológiásan aktív karotinoid pigmentek a biomembránban fehérjékhez kapcsolódva találhatók. A fotoszintetikus membrán fénybegyűjtő pigment-proteinjei és a reakciócentrumok protein komplexei is tartalmazzak karotinoidokat. Másrészt számos adatot találhatunk arra, hogy a karotinoid pigmenteknek egy bizonyos mennyisége közvetlenül a membránok lipid fázisában van jelen. Ez igaz a retina membránra (Bone és Landrum, 1984; Bone és mtsai, 1992), egyes fotoreceptorokra (Anton-Erxleben és Langer, 1987) és számos bakteriális és fotoszintetikus membránra is (Huang és Haug, 1974; Omata és Murata, 1984; Gombos és mtsai, 1987; Yurkov és mtsai, 1993). A magasabbrendű növényekben a xantofill ciklusban résztvevő pigmentek leválnak a fehérjéről és szabadon fordulnak elő a tilakoid membránban (Hager és Holocher, 1994).

A karotin molekulák „rúd alakú” szerkezettel rendelkeznek és vagy apolárosak, mint a  $\beta$ -karotin, vagy a végeiken poláros csoportokat tartalmaznak, mint a zeaxantin,

echinenon és myxoxantofill. Nem lehet véletlen egybeesés, hogy ezeknek a molekuláknak a hossza összevethető a növényi membrán hidrofób magjának a vastagságával (Gruszecki, 1999). A pigment molekulák szerkezete azt is meghatározza, hogy hol és milyen orientációban helyezkedhetnek el a membránban (5. ábra) és ezáltal milyen hatást fejtenek ki a membrán fizikai tulajdonságaira. Azzal, hogy jelenlétükkel korlátozzák a lipidek szabad mozgását, hiszen a merev „rúd alakú” karotin molekulák és a lipidek között hidrofób kölcsönhatások alakulnak ki, növelik a membrán rigiditását és fokozzák annak termotabilitását. Jelenlétükkel a membránban gátolhatják a kisebb molekulák, mint például a molekuláris oxigén vagy más anyagok, pl. szabad gyökök mozgását. Kísérletileg bizonyított tény, hogy ha liposzómák és hidroxil csoportot tartalmazó karotinoidok keverékét használták, akkor nem csak a lipid fázis rigiditása növekedett meg, hanem a mesterséges membrán proton áteresztő képessége is blokkolódott és ezzel párhuzamosan megnövekedett a glükóz molekulákra vonatkoztatott átengedő képessége (Berglund és mtsai, 1999).

Végül meg kell említeni a karotinoid molekulák nem elhanyagolható gazdasági szerepét. Mivel ezek a molekulák nem toxikusak, ezért az élelmiszeripar széles körben alkalmazza őket, mint ételszínezékeket (Bauernfeind, 1981). Bizonyos cianobaktérium törzseket, mint pl. a *Spirulina* sp.-t, nagy mennyiségben tenyésztik és állati takarmány valamint humán élelmiszer kiegészítőként használják (Sommer és mtsai, 1990). Ebből is látszik, hogy a cianobaktériumokban található karotinoidoknak jelentős biotechnológiai szerepük van és mivel mennyiségük a sejtekben a növekedési körülmények, környezeti paraméterek függvénye ezek tanulmányozása fontos.



## 2.4. A cianobaktériumok fotoszintézise, fénygátlás

### 2.4.1. A cianobakteriális elektrontranszportlánc komponensei

A cianobaktériumok fotoszintézise nagy mértékben hasonlít a magasabbrendű növények kloroplasztisaiban folyó fotoszintézishez. A tilakoid membránban három protein-komplexen és mobilis redox aktív komponenseken keresztül az elektronok a víz molekuláról a  $\text{NADP}^+$ -ra kerülnek (9. ábra). Ezekhez a folyamatokhoz a szükséges energiát az első (PSI) és második (PSII) fotokémiai rendszerben elnyelt fényenergia szolgáltatja.

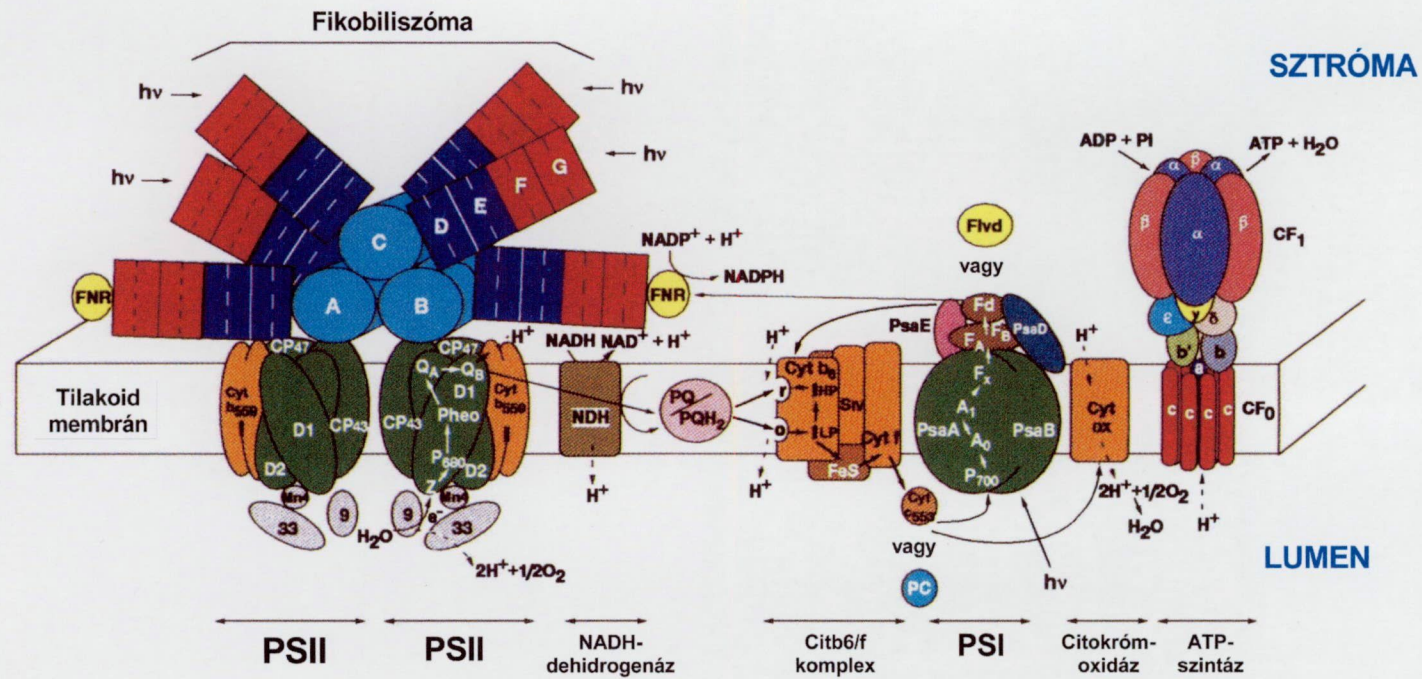
A cianobaktériumok a vörös és kék színű fényt ciklikus tetrapirrolok, a klorofilok, míg a zöld, sárga és narancs színű fényt nyitott láncú tetrapirrolok, a fikobilinek segítségével abszorbeálják. A fikobilinek kovalens kötással vízőldékony fehérjékhez kötődnek, a fikobiliproteinek szupramolekuláris komplexei a fikobiliszómák (9. ábra), melyek a cianobaktériumok elsődleges fénybegyűjtő antennái. Ezek összegyűjtik a fényenergiát, ami több lépésben a PSII reakciócentrum speciális klorofil- a molekulapárjára, a P680-ra jut (Hankamer és Barber, 1997). A reakciócentrum gerjesztését követő elsődleges töltésszétválás során először egy feofitin molekula (Pheo a 9. ábrán) - mely egy speciális, magnéziumot nem tartalmazó „klorofill” molekula – redukálódik. A donor oldalon a  $\text{P680}^+$  egy tirozin oldalláncot (Z) oxidál, mely képes a mangán-komplext tartalmazó vízbontó rendszert oxidálni. A redukált feofitin egy kötött plasztokinon molekulának, a  $\text{Q}_\text{A}$ -nak adja át az elektront. A  $\text{Q}_\text{A}$ -tól egy másik, két elektron tárolására alkalmas kinon molekula – a  $\text{Q}_\text{B}$  – veszi át az elektront. A  $\text{Q}_\text{B}$  egyszeresen redukált állapota viszonylag hosszú ideig stabilis, míg a kétszeresen



redukált forma gyorsan visszaoxidálódik, a két elektront egy 6-12 molekulából álló plasztokinon gyűjtőnek (PQ) adva át (McCauley és Melis, 1986).

A plasztokinont a Rieske-féle protein, mely vasat és ként tartalmaz, és a citokróm- $b_6/f$  oxidálja (az ábrán cyt  $b_6$  és cyt  $f$ ). A citokróm komplextől az elektront egy mobilis, réztartalmú protein, a plasztocianin (PC) szállítja tovább, ami a PSI reakciócentrumának oxidált primér donorát, a  $P700^+$ -t redukálja. A PSI akceptor oldalán a redukált ferredoxint (Fd) az elektrontranszportban a flavodoxin, majd a ferredoxin: $NADP^+$  oxidoreduktáz enzim követi, melynek neve magában foglalja funkcióját – redukált  $NADP$ -t hoz létre (Golbeck, 1994). A PSI és PSII működése következtében a membrán két oldalán elektromos és proton grádiens alakul ki. Ez működteti az ATP-szintáz enzim komplexet, ami a fotonok energiájának egy részét kémiai szabad energiává alakítva az ATP makroerg kötésébe építi be.

A fotoszintézisben résztvevő protein komplexek a membránban található (integráns) és a membrán felületéhez kapcsolódó (extrinzikus) fehérjékből épülnek fel. A cianobaktériumok és a magasabbrendű növények fotoszintetikus elektrontranszportban résztvevő komplexek fehérjei kis mértékben különböznek egymástól, pl. molekula tömegük különböző, de hasonló funkciókat látnak el. A PSII reakciócentrumában található heterodimer hidrofób fehérjék, a D1 és D2, kitüntetett szerepet játszanak. Minden prosztetikus csoport, amely részt vesz a PSII elektrontranszportjában, a D1-hez kapcsolódik, kivéve a  $Q_A$ -t, amely a D2-höz (Nanba és Satoh, 1987). A két fotoszisztéma fehérje komponensei intenzív kutatások tárgyát képezik. Ennek ellenére sok ismert fehérje alegység szerepe még tisztázatlan.



9. ábra: A cianobaktérium tilakoid membránjában található elektrontranszportban résztvevő komponensek Bryant (1994) alapján. Részletes magyarázat a szövegben.

#### 2.4.2. A fénygátlás

Fénygátlásnak vagy fotoinhibíciónak nevezzük azt a folyamatot, amikor túl sok fény hatására olyan sérülések következnek be a fotoszintetikus apparátusban, a PSII elektrontraszportjában, amelyeket a helyreállító mechanizmusok már nem képesek kompenzálni és a D1 protein degradációjához vezetnek (Nanba és Sato, 1987, Aro és mtsai, 1990).

A fotoinhibíció két típusát írták le (Aro és mtsai, 1993), az alapján, hogy a PSII reakciócentrumának, a P680-nak a donor vagy akceptor oldalán történik az elektrontranszport gátlása erős fény hatására. Ha a P680 több elektront transzportál a plasztokinon gyűjtő (PQ) felé, mint amennyit az fel tud venni, akkor a  $Q_A$  kétszeresen redukálódik, protonálódik és kikötődik (Vass és mtsai, 1992). A következő elektron a feofitinről nem képes tovább lépni és  $P680^+Pheo^-$  töltésrekombináció történik. A P680 klorofill triplett állapotba kerül, mely oxigénnel reagálva szingulett oxigént hozhat létre (Hideg, 1997) és ez okozza a D1 fehérje sérülését, mely végül proteolízishez vezet. Ha a donor oldalon inaktív a vízbontó rendszer, akkor a tirozin oldalláncon és a P680-on pozitív töltések halmozódnak fel, ami gerjesztett állapotú karotinoid és klorofill molekulák keletkezését indukálja. Ezek a molekulák reakcióba léphetnek a D1 fehérjével, megváltoztatják annak konformációját úgy, hogy az autoproteolízál és kiválik a PSII komplexből. Miután a D1 kivált, a PSII-ről leválnak a vízoldható fehérjék, a komplex szétesik. A helyreállítás, a PSII regenerációja a D1 protein *de novo* szintézisével indul, melynek során pre-D1 protein keletkezik. Ez a pre-D1 fehérje felhalmozódik a tilakoid membránban, de még fotoszintetikusan nem aktív. Egy C-

terminális proteáz hasítja a fehérjét, kialakul az aktív D1 fehérje (Aro és mtsai, 1993) és a PSII komplex újra visszanyeri fotoszintetikus aktivitását.

Alacsony hőmérsékleti fotóinhibíciónak nevezik azt a jelenséget, amikor a fotoszintetizáló szervezetek alacsony hőmérséklettel szembeni érzékenysége megnő, ha az alacsony hőmérséklet mellett magas fényintenzitással világítjuk meg őket (Greer és mtsai, 1991; Öquist és mtsai, 1987).

Megvizsgálták néhány mutáns cianobaktérium törzs alacsony hőmérsékleti fotoinhibícióval szembeni érzékenységét, hogy tisztázzák a telítetlen membrán lipidek szerepét a fotoinhibíció folyamatában.

A *Synechocystis* sp. PCC6803 mutációjával a deszaturációban hiányos mutánsokat lehet létrehozni (Gombos és mtsai, 1992). A *desD*<sup>-</sup> sejtekből hiányzik a  $\Delta 6$  deszaturáz, míg a *desA*<sup>-</sup>/*desD*<sup>-</sup> sejtek csak egyszeresen telítetlen lipideket tartalmaznak. Az utóbbi mutáns sejtjeit vizsgálva azt találták, hogy alacsony hőmérsékleti fotoinhibícióval szemben sokkal érzékenyebbek, mint a vad típus, amelynek membránjában többszörösen telítetlen lipidek is jelen vannak (Gombos és mtsai, 1994; Tasaka és mtsai, 1996). A  $\Delta 6$  deszaturáz hiányos mutáns nem mutatott nagyobb érzékenységet, mint a vad típus.

A *desA* génnel transzformáltak olyan vad típusú *Synechococcus* PCC7942 sejteket, amelyeknek membránjában csak telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak alkotják a kettősrétegét. Az így kapott sejtek lipid összetétele megváltozott, megjelentek a kétszeresen telítetlen zsírsavak, és azt tapasztalták hogy ez az alacsony hőmérsékleti fényátlással szembeni toleranciát növelte a vad típusú sejtekhez képest.

A fotoinhibíció fokát két tényező befolyásolja. Egyrészt függ a nagy fényintenzitás okozta károsodás mértékétől, a D1 protein degradációjától; másrészt attól, hogy milyen gyorsan tud a károsodott PSII komplex regenerálódni - az újonnan szintetizálódott, vagy esetleg regenerálódni képes károsodott D1 fehérje beépülni a helyére - és visszanyerni az aktivitását. A fotoinhibíció mértéke ennek a két folyamatnak az egymáshoz viszonyított sebességétől, ill. a kialakult egyensúlytól függ.

Annak érdekében, hogy kiderítsék, milyen szerepet játszik a fotoinhibíció kialakulásában a lipidek telítetlensége megvizsgálták a D1 fehérje szintézisét vad típusú és *desA/desD* sejtekben. A D1 fehérje ellen készített ellenanyag segítségével kimutatták, hogy a fotoinhibíció során degradálódott D1 fehérje membránból való kijutását a lipidekben található zsírsavak telítettségi foka nem befolyásolta. A D1 fehérjét kódoló gén (*psbA*) transzkripciójában nem volt különbség a mutáns és a vad típus között.

Kimutatták, hogy a lipid telítetlenség nem befolyásolja a D1 degradációját sem. Izolált tilakoidok membránokkal végzett mérések során, amikor nincs fehérjeszintézis, ugyanerre a következtetésre jutottak. Ugyanakkor a kísérletek igazolták, hogy a telítetlen zsírsavak a PSII fotoinhibíció utáni regenerálódására hatnak, gyorsítva az újonnan szintetizálódott D1 fehérje membránba való beépülését és aktiválódását. Az eredmények azt erősítik meg, hogy a pre-D1 fehérje D1 fehérjévé való átalakítása többszörösen telítetlen lipideket igényel a membrán környezetben (Kanervo és mtsai, 1997).

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. A felhasznált cianobaktérium törzsek tenyésztési körülményei

##### 3.1.1. *Synechocystis* sp. PCC6803

Ezt a törzset fotoautotróf körülmények között BG 11 médiumban neveltük, mely 4 mM 2-[4-(2-hydroxyetil)-1-piperaziny] etánszulfonsav (HEPES)-NaOH-t, (pH 7,5) tartalmazott. A kultúrák hőmérsékletét termosztáttal szabályoztuk, a fényintenzitás  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  volt. A kultúrákat steril levegővel buborékolattuk, amely 1%  $\text{CO}_2$ -ot tartalmazott (Ono és Murata, 1981).

##### 3.1.2. *Synechocystis* pgsA<sup>-</sup> (PG hiányos) mutáns

A *Synechocystis* pgsA<sup>-</sup> mutánst (Hagio és mtsai, 2000) a vad típusnál használt médiumban neveltük, mely 20  $\mu\text{g/ml}$  kanamicint és 20  $\mu\text{M}$  dioleoyl-PG-t (P9664, Sigma, St. Louis, MO) is tartalmazott. Az agaron való neveléshez a fenti médiumhoz 1,2 % (w/v) agart adtunk. A nevelési hőmérséklet 30 °C, a fényintenzitás  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  volt. A kultúrák levegőztetését állandó rázatással oldottuk meg (NR-3, TAITEC, Saimata, Japan, 120/min). A sejtek szaporodását az optikai denzitás mérésével ( $\text{OD}_{750}$ ) követtük.

##### 3.1.3. *Cylindrospermopsis raciborskii* tenyésztése

A *Cylindrospermopsis raciborskii* ACC9051 sejteket a MTA, Tihanyi Limnológiai Intézetből kaptuk és módosított BG 11 (a mikroelemekből az eredeti recept szerinti koncentráció 10%-át adjuk) médiumban neveltük. A különböző nevelési hőmérsékleteket termosztáttal biztosítottuk. Az alkalmazott fényintenzitás  $0.04 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -

tól  $1.0 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -ig terjedt, a steril levegő, amellyel a kultúrákat buborékolattuk 1%  $\text{CO}_2$ -ot tartalmazott.

### **3.2. A sejtmembránok izolálása**

A cianobaktérium sejteket  $5000\text{g-s}$ , 10 perces centrifugálással gyűjtöttük és  $5 \text{ mM-os TES-NaOH}$  (pH: 7,0) pufferrel mostuk. Ezután a sejteket felszuszpendáltuk az előbbi pufferben, mely tartalmazott még  $600 \text{ mM}$  szaharózt és  $2\text{mM}$  EDTA-t is. Az így kapott sejtuszuspenzióhoz lizozimet adtunk és az enzimes emésztést sötétben, szobahőmérsékleten, két óra hosszan végeztük. A sejtek feltörése „French pressure cell” segítségével történt,  $2 \times 10^7 \text{ Pa}$  nyomással (Omata és Murata, 1983). A következő izolálási lépéseket  $4 \text{ }^\circ\text{C-on}$  végeztük. Proteáz gátlóként  $0.1 \text{ ml}$  3%-os, metanolban oldott fenil-metil-szulfonil-fluoridot használtunk a homogenizátumhoz (Sato és Murata 1980).  $40000\text{g-s}$ , 15 perces centrifugálással szabadultunk meg a fel nem tárt sejtektől, illetve a számunkra szükségtelen sejtörmeléktől. A felülúszóból cukorgrádiens centrifugálással,  $130000\text{g-vel}$ , 18 órán át, választottuk el az egyes membránfrakciókat. Lépcsős cukorgrádiens alkalmaztunk. A citoplazmás membránok a 30%-os cukorlépcsőben jelennek meg. Narancssárga színük alapján a többi membránfrakciótól könnyen elkülöníthetők és azonosíthatók. Az egyes, jól elkülönült membránfrakciókat a grádiensből injekciós tű segítségével nyertük ki, a frakciókat hígítottuk és a membránokat egy ismételt centrifugálással ( $120000\text{g}$ , 2 óra) üleptítettük.

A tilakoid membrán klorofill tartalmát a 80%-os acetonos kivonat spektrofotometriás mérésével határoztuk meg (Arnon, 1949).

### **3.3. Lipid és zsírsav analízis**

#### **3.3.1. Lipid extrakció és elválasztás**

A lipideket Bligh és Dyer (1959) által leírt módon nyertük ki a sejtekből. A sejteket kloroform és metanol 1:2 arányú elegyével extraháltuk. A lipidek analízisét és lipid osztályokra történő elválasztását Sato és Murata (1980) módszere alapján végeztük. A lipidek elválasztásához szilikagél vékonyréteg lapokat (Merck 5721) használtunk, az alkalmazott futtatóelegy kloroform, metanol és 28%-os ammónium-hidroxid (65:35:5) elegye volt. A futtatást szobahőmérsékleten végeztük. Az elkülönült lipid frakciókat UV fény alatt azonosítottuk, majd a szilikagélt lekaparva, visszaoldottuk.

#### **3.3.2. Zsírsavanalízis**

A lipid kivonatokat 5% HCl-t tartalmazó metanolban 80 °C-on, 3 óra hosszat észteresítettük. A kapott zsírsav-metilésztereket gázkromatográf segítségével azonosítottuk és határoztuk meg mennyiségüket. A zsírsav-metilésztereket FFAP kapilláris oszlopon (Supelco, Bellefonte, PA) (30 m×0.25 mm) választottuk el egymástól. A zsírsavak egymáshoz viszonyított mennyiségét a kromatográfiás csúcsok területeinek integrálásával számítottuk ki. Az abszolút mennyiségek kiszámításához belső standardként 15:0 zsírsavat adtunk ismert mennyiségben a mintáinkhoz.

### **3.4. Karotinoidok elválasztása**

A karotinoidokat szilikagél vékonyréteg kromatográfiával választottuk el (Hager és Meyer-Bertenrath, 1966). Futtatóelegyként petroléter és 2-propanol elegyét (20:1) használtuk. Az egyes karotinoidok mennyiségét spektrofotometriásan határoztuk meg az irodalomból vett extinkciós koefficiensek felhasználásával.



A karotinoidok HPLC-vel történő analiziséhez (nagy felbontású folyadék kromatográf) Waters Chromatography Division, Millipore GmbH, Waters 996 fotodiódát, Waters 717 mintaadagolót és PC-t, Software Millenium 2100 rendszert használtunk, Nucleosil C18-5  $\mu$ , 300A (250x5x4mm) oszloppal (Macherey and Nagel, Duren, Germany).

A komponensek azonosítása spektrumuk alapján történt, a mennyiségi meghatározáshoz  $\beta$ -karotint használtunk, mint belső viszonyítási alapot. Az eredményeket klorofill tartalomra vonatkoztattuk.

### 3.5. *Fotoszintetikus elektrontranszport aktivitások mérése*

*A fotoszintetikus oxigénfejlődés mérését intakt sejteken* Clark típusú oxigén elektródával végeztük Gombos és mtsai, (1991) leírása alapján. Az oxigén elektródot minden adott hőmérsékleten az oxigén nézve telített víz értékekre ( $O_2$   $\mu$ mol) normáltuk. A mérés során mesterséges elektrondonorokat és akceptorokat nem használtunk. A méréshez a sejteket kétszer mostuk BG11 médiumban és ugyanebben a médiumban felfuszpendáltuk úgy, hogy a klorofill tartalom kb. 2  $\mu$ g/ml legyen. Az intakt sejteket 600  $\mu$ mol  $m^{-2}s^{-1}$  intenzitású aktinikus fénnel világítottuk meg, a mintatartó elé egy vörös optikai szűrőt (VR620, Hoya Glass Co., Tokyo) és egy infravörös-abszorpciós filtert (HA-50; Hoya Glass) szereltünk, a megvilágítás utáni oxigénfejlesztést mértük.

*A cianobaktériumok második fotoszisztémája (PSII) aktivitásának mérését* 50 mM HEPES-NaOH, (pH:7.5) pufferben végeztük. Akceptorként 0.1 mM 1.4-benzokinont használtunk (Ono és Murata, 1981).

A P700 fényindukálta redox változását egész sejtekben egy ED-800T típusú emitter-detektor egységgel felszerelt PAM 101 (pulse-amplitude-modulated) készülékkel (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) mértük meg, Schreiber és mtsai. (1988) módszere szerint. A sejteket lecentrifugáltuk és friss BG11 médiumban szuszpendáltuk úgy, hogy a klorofill koncentráció 30  $\mu\text{g/ml}$  legyen. A mintát telítési fehér fénnel gerjesztettük addig, amíg az abszorpció változása 820 nm-nél el nem érte a steady-state állapotot (kb. 5s), majd mértük a P700<sup>+</sup> megvilágítás utáni redukcióját. Az oxidálható P700 mennyiségét 10  $\mu\text{M}$  3-(3, 4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) és 50 mM metilviologén jelenlétében mértük meg.

A fluoreszcencia indukció kinetikáját PAM 101 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) fluoriméterrel mértük meg. A 2-5  $\mu\text{g}$  klorofill/ml koncentrációjú mintákat mérés előtt 5 percig sötétben tartottuk, majd gyenge, 0.05  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású mérőfénnel meghatároztuk az  $F_0$  értékét. Az  $F_m$  (maximális fluoreszcencia) értékét egyetlen, 1 másodperces, telítési fénypulzus segítségével határoztuk meg, A telítési fénypulzust, ami az összes  $Q_A$ -t képes kiredukálni, szűrővel ellátott (Calflex CK 65, Blazers, RG 630, Schott) halogén lámpával (KL-1500 electronic, Schott Glasswerke, Wiesbaden, Germany) állítottuk elő. Az  $F_m$  és  $F_0$  értékek különbségét, mint a változó fluoreszcenciát ( $F_v$ ) vettük számításba. A fluoreszcenciában bekövetkező változásokat cianobaktériumoknál az irodalomban szokásos módon (Ermaikova-Gerdes és Vermaas, 1998), az  $F_0$ -ra normált  $F_v$  értékekkel jellemeztük.

A termolumineszcencia méréseket Wiessner és Demeter szerint (1984) végeztük laboratóriumunkban kifejlesztett mérőberendezéssel. 0,4 ml térfogatú mintát 30 másodpercig gerjesztettünk -80 °C-on folyamatos fehér fénnel, melynek intenzitása 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  volt. A TL görbét 20°C/min melegítés mellett vettük fel.

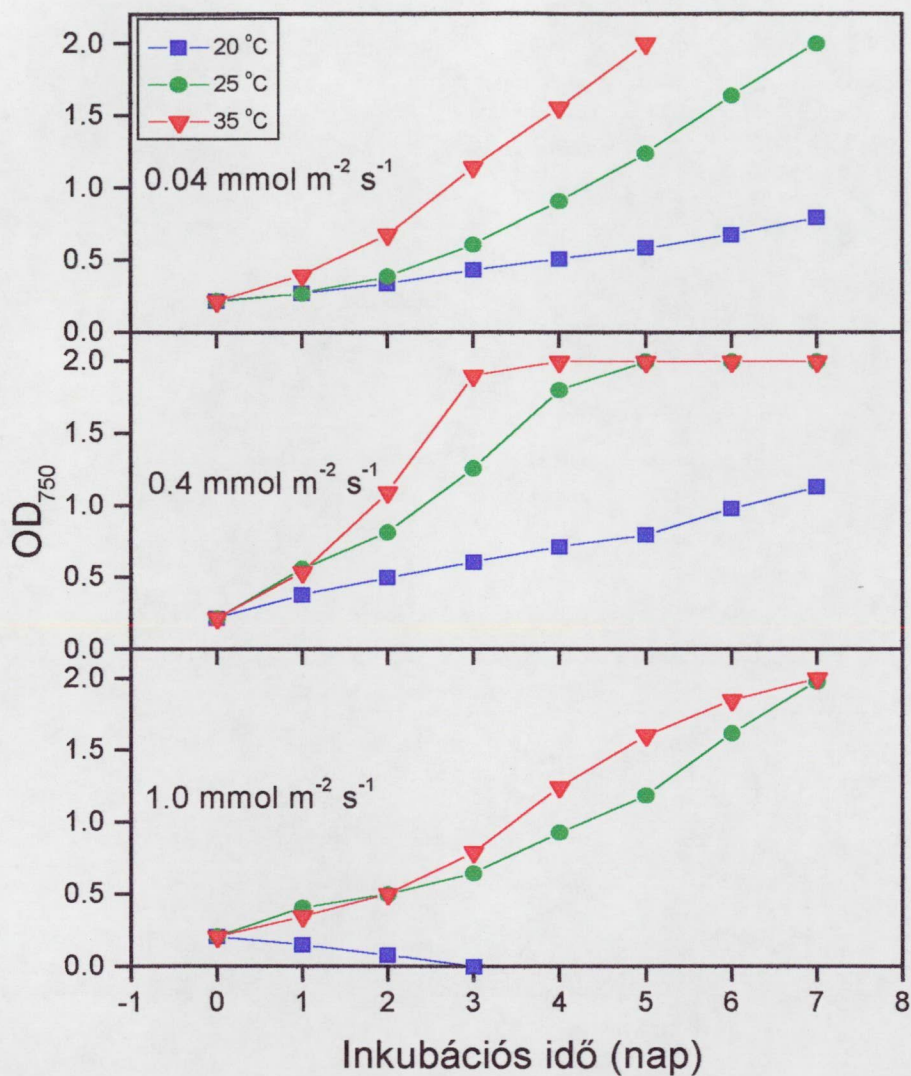
## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 4.1. A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek szaporodásának vizsgálata

A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek élettani jellemzése érdekében megmértem a szaporodási görbéket. Miután bennünket elsősorban a fényintenzitás, illetve a nevelési hőmérséklet hatása érdekelt, így ezeket a környezeti faktorokat változtattuk.

A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek osztódásának sebessége függött mind a hőmérséklettől, mind a fényintenzitásától. Minden vizsgált hőmérsékleten a  $0.4 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitás bizonyult a legkedvezőbbnek a sejtek osztódásának szempontjából.  $1.0 \text{ mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitás mellett a sejtek  $25^{\circ}\text{C}$  alatti hőmérsékleten már képtelenek voltak az osztódásra, ezen a fényintenzitáson a  $20^{\circ}\text{C}$ -on nevelt kultúra sejtjei egy két nap alatt elpusztultak. Ilyen magas fényintenzitáson a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek, bár a membránjaikat felépítő lipidek zsírsav és pigment összetételének jelentős megváltoztatásával reagálnak (részletesen a következő fejezetekben), ezek a változások nem képesek a károsodást ezen a hőmérsékleten már nem tudják kivédeni.

Ezek a megfigyelések arra a megállapításra vezettek, hogy alacsonyabb hőmérsékleten és magasabb fényintenzitásokon a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek esetében is jelentkezik a sejtek osztódásának a gátlása, amit korábban más cianobaktériumoknál is megfigyeltek (Tasaka és mtsai, 1990).



10. ábra: *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek szaporodása, különböző fényintenzitásokon és hőmérsékleteken (-■- 20 °C; -●- 25 °C; -▼- 35 °C).

#### **4.2. Fotoszintetikus aktivitás – elektrontranszport**

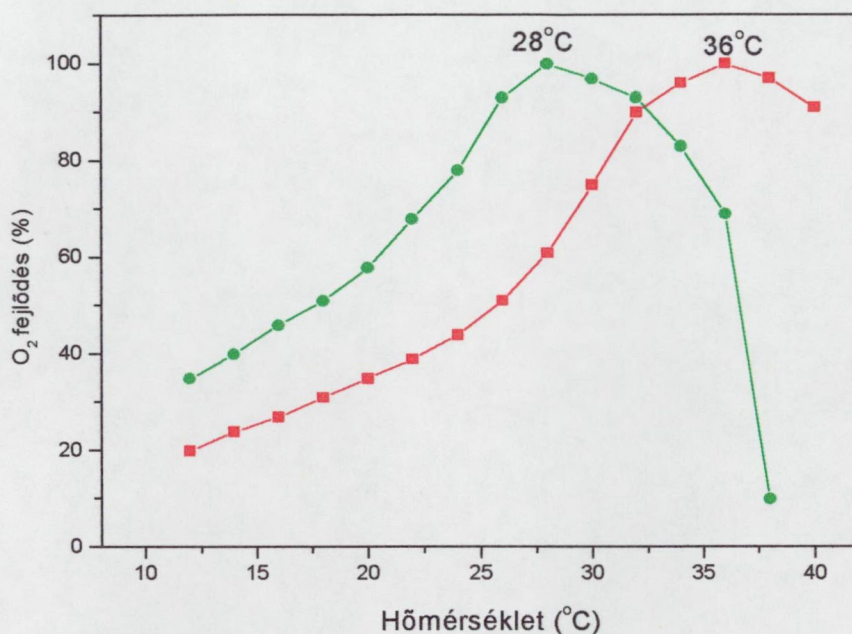
Az irodalomból ismert, hogy alacsonyabb hőmérsékleten közepes fényintenzitások mellett is fellép a fénygátlás, jóllehet magasabb hőmérsékleteken ugyanezen fényintenzitásnál a gátlás nem jelentkezik (2.4.2. fejezet). Ezért megmértem a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek fotoszintetikus oxigén fejlesztő képességét különböző hőmérsékleteken és különböző fényintenzitásokkal történt előmegvilágítások után .

A fotoszintetikus elektrontranszport aktivitásának változása - amelyet a fotoszintetikus oxigénfejlesztő képesség mérésével követtünk – jelentős hőmérsékletfüggést mutatott, jó egyezésben az aktivitás más cianobaktérium törzsben mért hőmérsékletfüggésével (Gombos és mtsai, 1991).

Abban az esetben, ha a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejteket 25°C-on neveltem, akkor a fotoszintetikus aktivitás maximuma 28-29°C körül volt, míg a 35°C-on nevelt sejteknél a maximális aktivitást 36 °C-nál kaptam (11. ábra). A hasonló körülmények közt nevelt *Synechocystis* PCC6803 sejtek esetében a maximális aktivitás értéke nem mutatott ilyen mértékű eltérést. Ott a maximumokat 39 ill. 42°C-nál találtuk.

A méréseket különböző fényintenzitásokon nevelt *C. raciborskii* sejtekkel is elvégeztem és azt tapasztaltam, hogy a sejtek fotoszintézise a maximális aktivitást ugyanazoknál a hőmérsékleteknél éri el. Tehát a sejtek nevelésénél alkalmazott fényintenzitás a maximális aktivitás hőmérsékletfüggését nem befolyásolta olyan mértékben, mint a nevelési hőmérséklet.





11. ábra: A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek O<sub>2</sub> fejlesztésének hőmérsékletfüggése. Az oxigén fejlődést Clark elektród segítségével követtük. Az elektródot minden hőmérsékleten a desztillált víz oldott oxigén tartalmára kalibráltuk. A sejteket -●- 25°C-on és -■- 35°C-on neveltük, az oxigénfejlesztés értéke (100%)  $410 \pm 15 \mu\text{mol O}_2/\text{mg klorofill}/\text{óra}$  és  $375 \pm 10 \mu\text{mol O}_2/\text{mg klorofill}/\text{óra}$  volt.

Ezekből az eredményekből arra következtettem, hogy a *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsben olyan adaptációs mechanizmus áll a sejtek rendelkezésére, ami a *Synechocystis* PCC6803 sejtekben nem található meg.

### 4.3. *Membrán lipid vizsgálatok – zsírsavanalízis*

#### 4.3.1. *A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek lipid összetétele*

Ebben a cianobaktérium törzsben, a többi cianobaktériumhoz és a magasabbrendű növények kloroplasztiszaihoz hasonlóan, négy fő lipidet tudtam azonosítani, MGDG-t, DGDG-t, SQDG-t és PG-t. A négy lipid osztály százalékos megoszlása nem mutatott eltérést a szokásostól (l. 10. oldal). A különböző hőmérsékleten nevelt minták lipid összetétele nem mutatott eltérést egymástól.

Ez az eredmény megerősítette azt az általánosan elfogadott elképzelést, hogy a cianobaktériumok nem a lipid fejcsoport megváltoztatásával alkalmazkodnak a környezetükben bekövetkező változásokhoz. A továbbiakban a lipidekben található zsírsavak telítettségét vizsgáltam meg.

#### 4.3.2. *A nevelési hőmérséklet hatása a *Cylindrospermopsis raciborskii* és *Synechocystis* PCC6803 sejtek zsírsav összetételére*

Összehasonlítottam a 25°C-on és 35°C-on nevelt *Synechocystis* PCC6803 sejtek lipidjeinek zsírsav összetételét (1. táblázat).

Az alacsonyabb hőmérsékleten nevelt sejtek  $\alpha$ -18:3 (linolénsav) és 18:4 (oktadekatetraén sav) zsírsavakat tartalmaztak, ezeknek a szintézise 30°C alatti hőmérsékleten indukálódik (Wada és Murata, 1990). A 25°C-on nevelt sejtekben a többszörösen telítetlen zsírsavak 34%-át tették ki az összes zsírsavnak, míg 35°C-on ez az érték 32%-nak adódott. Az egyszerűen telítetlen zsírsavak, a palmitoleilsav és az

olajsav együttes koncentrációját nem befolyásolta a szaporodási hőmérséklet változása. A telített zsírsavak, a palmitinsav és a sztearinsav együttes mennyisége kis mértékben növekedett a többi zsírsavhoz képest magasabb nevelési hőmérsékleten.

1. táblázat: 25°C-on és 35°C-on nevelt *Synechocystis* PCC6803 sejtek glicerolipidjeinek zsírsav összetétele

Nevelési hőmérséklet, °C	Zsírsav összetétel, rel. %							
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	γ-18:3	α-18:3	18:4
25	52	4	1	9	10	15	5	4
35	55	3	1	9	14	18	ny	ny

ny: nyomnyi mennyiség (< 0.5%). Az értékek három, egymástól független kísérlet eredményeiből származnak, az átlagos eltérés az értékek  $\pm 2\%$  -a.

Látható, hogy az alacsonyabb nevelési hőmérséklethez történt adaptáció igen kis mértékű változásokat eredményez *Synechocystis* PCC6803 sejtek esetében..

A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben, a *Synechocystis*hez hasonlóan, a fő zsírsav komponensek a palmitin-, linol-, α-linolén-, olaj-, γ-linolén-, sztearin-, és oktadekatetraén savak voltak (2. táblázat). Ez alapján a zsírsav összetétel alapján megállapíthatjuk, hogy a *C. raciborskii* a cianobaktériumok zsírsav deszaturáció szerinti besorolásában (Kenyon és mtsai, 1972) a negyedik csoportba tartozik.

A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége 35°C-os nevelési hőmérsékleten 34% volt. Ez 25°C-os nevelési hőmérsékleten 54%-ra emelkedett. A nevelési hőmérséklet csökkenésével a linolsav mennyisége 19%-ról 2%-ra csökkent, míg az α-linolénsav és az oktadekatetraén sav mennyisége 11%-ról 49%-ra emelkedett. A zsírsav összetételnek ez a feltűnően



nagyfokú változása, amit a nevelési hőmérséklet változtatásával értünk el, összehasonlítva a *Synechocystis* sejtek zsírsav összetételének változásával, nagyfokú adaptációs képességre utal. A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben a nevelési hőmérséklet indukált változásokat a 12. ábra is szemlélteti.

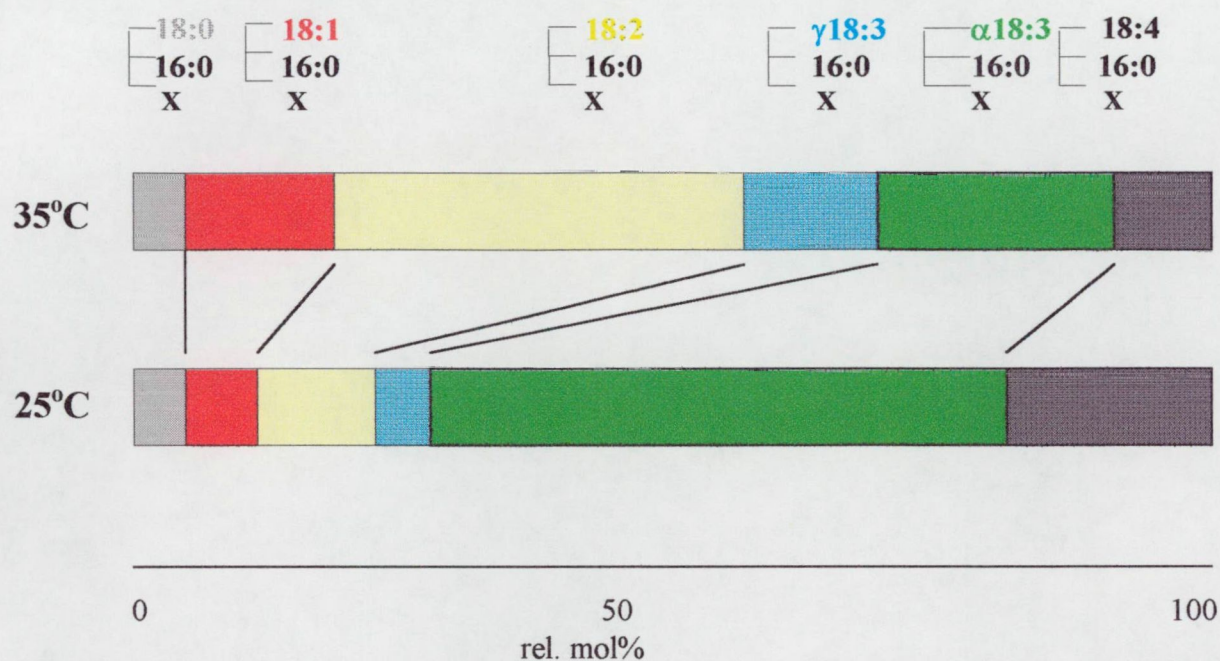
Mint ahogy azt feltételeztük, a telített zsírsav mennyisége és aránya a telítetlenekéhez viszonyítva (sat%/unsat%) számottevően csökkent az alacsonyabb hőmérsékleten és ezzel párhuzamosan a kettős kötés index (double bound index, DBI) növekedett (3. táblázat).

A zsírsavösszetétel változását alacsony ( $0.04 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), közepes ( $0.2$  és  $0.4 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) és magas ( $1.0 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) fényintenzitások mellett is megmértük. Miután a különböző fényintenzitásokon nevelt sejtek zsírsav összetételei szignifikánsan különbségeket nem mutattak, így megállapíthattuk, hogy a nevelési hőmérséklet az, ami a meghatározó tényező, míg a fényintenzitás változása nem befolyásolja a zsírsav telítetlenséget.

2. táblázat: Különböző hőmérsékleteken és fényintenzitásokon nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek zsírsav összetétele.

nevelési hőmérséklet    fényintenzitás		zsírsav tartalom (rel.%)							
°C	$\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	$\gamma$ 18:3	$\alpha$ 18:3	18:4
25	0.04	44	4	1	3	5	2	29	12
35	0.04	47	3	2	6	19	6	12	5
25	0.20	45	1	2	3	4	2	30	13
35	0.20	49	2	2	6	19	5	12	5

Az értékek három, egymástól független kísérlet eredményeiből származnak, az átlagos eltérés az értékek  $\pm 2\%$  -a.

12. ábra: A *Cyindrospermopsis raciborskii* sejtek lipid összetétele

3. táblázat: A cianobaktériumok glicerolipid összetételének jellemzői két különböző nevelési hőmérsékleten

	nevelési hőmérséklet, °C	unsat%/sat%	DBI
<i>Synechocystis</i> PCC6803	25	$0.89 \pm 0.05$	$1.09 \pm 0.05$
	35	$0.79 \pm 0.04$	$0.94 \pm 0.05$
<i>Cyindrospermopsis</i> <i>raciborskii</i>	25	$1.50 \pm 0.07$	$1.90 \pm 0.06$
	35	$1.08 \pm 0.05$	$1.03 \pm 0.05$

unsat%/sat%, ez a szám mutatja a telítetlen (unsat) és telített (sat) zsírsavak arányát;  
DBI, (double bond index) kettőskötés index, a telítetlen zsírsavak százaléka szorozva  
a kettős kötések számával

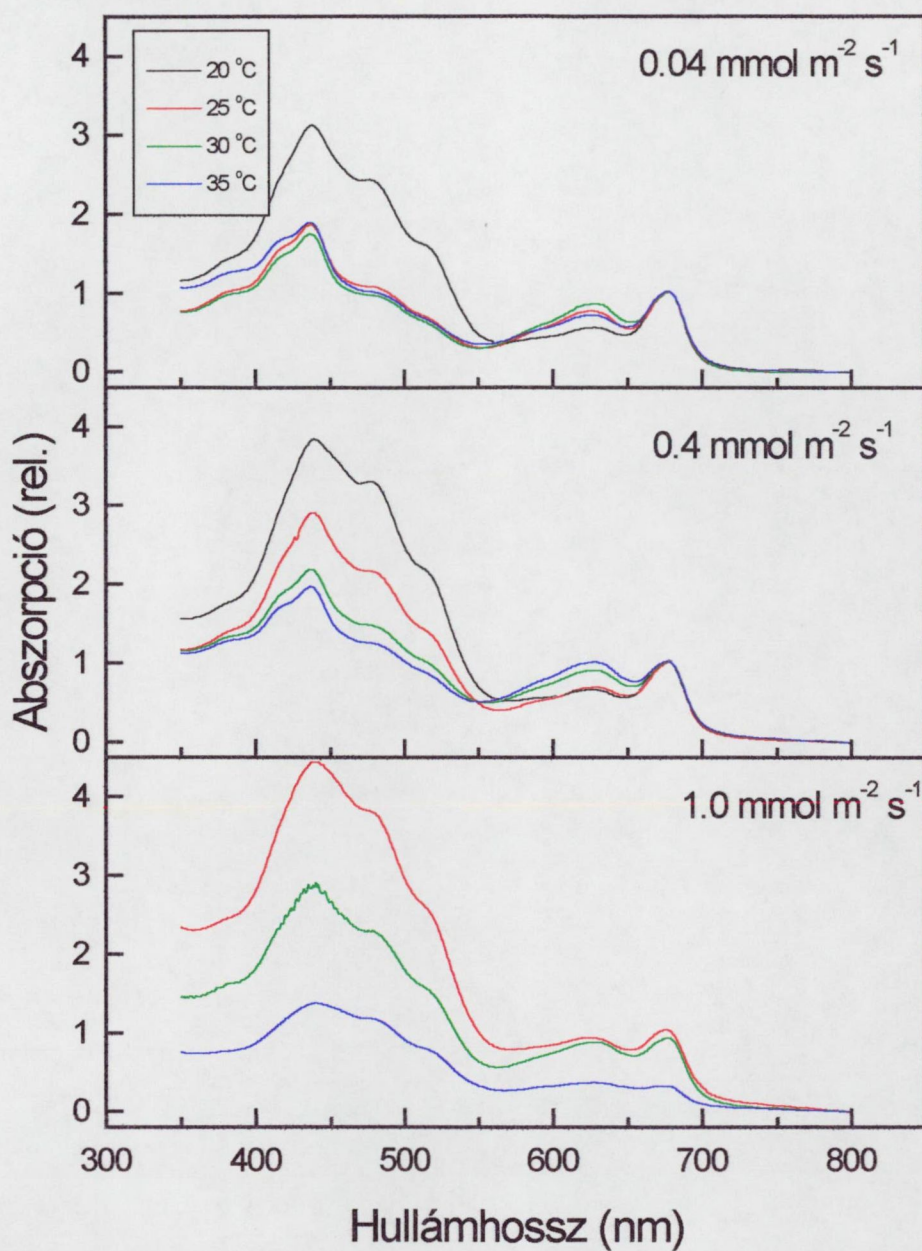
#### 4.4. A *Cylindrospermopsis raciborskii* karotinoid összetétele

A *Cylindrospermopsis raciborskii* fokozott alacsony hőmérsékleti adaptációs képességének a megértéséhez más, az eddigiekben nem vizsgált tényezők hatását is figyelembe kell venni, amelyek felelőssé tehetők a membránok szerkezetének és dinamikájának változásaiért. Ilyen tényező lehet a karotinoid összetétel, amely a környezeti hatások függvényében nagyon jelentősen változik a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben, a xantofilok a membránban igen magas koncentrációt érhetnek el, és ezzel meghatározó szerepet kaphatnak a membrándinamika alakításában.

Megfigyeltük, hogy magas fényintenzitáson a sejtek elhalványodnak, sárgulnak. Abszorpciós spektrumuk alapján (13. ábra) megállapítható a 400 és 500 nm közötti tartomány jelentős változásai alapján, hogy a nevelési hőmérséklet csökkenésével a karotinoidok aránya a klorofillhoz és a fikobiliproteinekhez képest nagy mértékben megnő. A karotinoidok relatív felhalmozódásának tudható be a fényintenzitás növekedésével bekövetkező változás is.

Amikor az abszorpciós spektrumokat összevetettük az OD (750 nm)-re normált mintákban mért klorofill-a koncentrációkkal, akkor azt találtuk, hogy az igen magas,  $1.0 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitáson nevelt sejtekben a klorofill-a koncentrációja nagy mértékben lecsökkent. Ezek a sejtek a  $0.04 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fényintenzitáson nevelt sejtek klorofill-a tartalmának csak kb. 30%-át tartalmazták. Láthatjuk azt is, hogy a karotinoid/klorofill arány a magas fényintenzitáson és alacsony hőmérsékleten nevelt sejtekben jelentősen nőtt. Ez arra utal, hogy a karotinoidok nem kizárólagosan csak a fotoszintetikus apparátus fehérjéihez kötve illetve azok környezetében fordulhatnak elő.

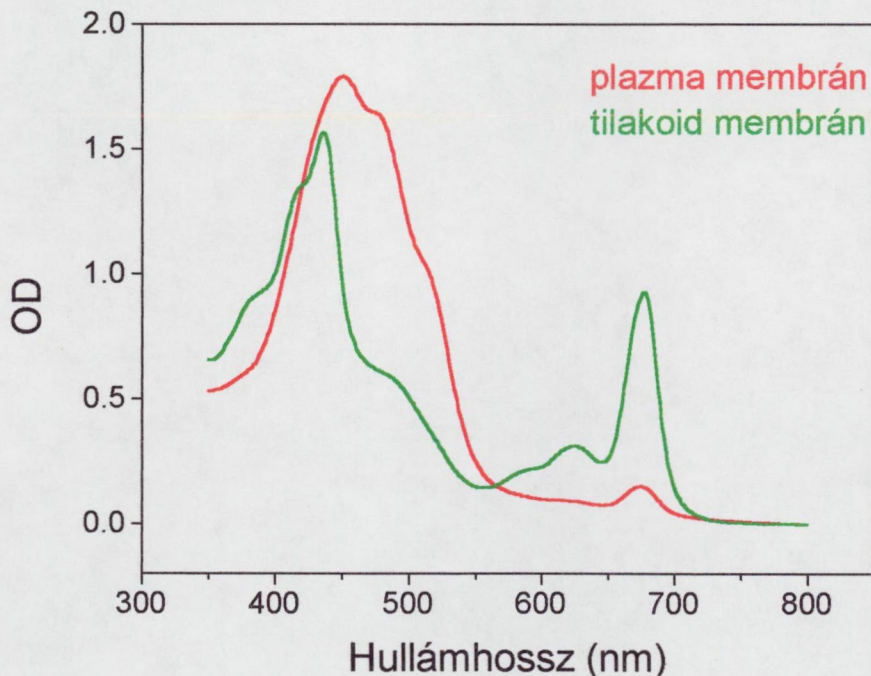




13. ábra: Különböző hőmérsékleteken (20°C-on —; 25°C-on —; 30°C-on —; 35°C-on —) és fényintenzitásokon nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek abszorpciós spektrumai, klorofill tartalomra normálva (kivéve az 1.0 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitáson, 35°C-on nevelt sejtek abszorpciós görbéje).

A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekkel végzett kísérleteink eredményei hozzájárulnak annak a hipotézisnek a bizonyításához, mely szerint a karotinoidok egy része szabadon, a lipid fázisban található meg (5. ábra) (Gruszczyk, 1999; Havaux és Nyogi, 1999).

A 0.04, 0.2, 0.4 és 1.0 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitáson, 25°C-on és 35°C-on nevelt sejtekből tilakoid és plazmamembránokat izoláltunk. Lépcsős cukor gradiensen, 18 órás ultracentrifugálással választottuk szét az előzőleg lizozimos emésztéssel feltárt sejtek membránjait, mint ahogy az részletesen az Anyag és Módszer fejezetben megtalálható. Először megmértük az izolált membránfrakciók spektrumát (14. ábra).



14. ábra: 0.04 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitáson és 35 °C-on nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekből izolált membránok spektrumai.



Látható, hogy a tilakoid membránban 435 nm-en a klorofill sáv mellett - ami legjelentősebb pigment - a 450–500 nm-nél megfigyelhető karotinoid és a 620 nm-nél látható fikocianin sáv jelentős. A citoplazmás membránban a karotinoidok jelentik a legjelentősebb pigmentet, fikocianin nem található benne. Ezek az összetételek megegyeznek más cianobaktériumokban kapott pigment összetételekkel (Masamoto és mtsai., 1999). A citoplazmás membrán feltűnően nagy karotinoid tartalma is erősíti azt az elképzelést, hogy a membrán lipid fázisában szabad karotinoidok találhatók.

A membránok pigment-analízisét HPLC rendszer segítségével végeztem. A komponensek azonosítása a spektrumuk alapján történt, a mennyiségi meghatározáshoz  $\beta$ -karotint használtunk, mint belső viszonyítási alapot. Az eredményeket klorofill tartalomra vonatkoztattuk.

A *Cylindrospermopsis raciborskii* mintákban négy karotinoid származékot, echinenont (4-oxo- $\beta$ -karotin), zeaxantint, myxoxantofillt,  $\beta$ -karotint sikerült azonosítanom, illetve a spektrumok alapján feltehető, hogy a mintákban megjelentek ezen komponensek különböző izomerjei is. Ezek között két olyan karotin származék is található, mely nincs jelen több más törzsben, pl. a *Synechococcus* PCC6301 (*Anacystis nidulans*) és PCC7942 (*Anacystis nidulans* R2) törzsekből hiányzik a myxoxantofill (6. ábra) és az echinenon (4-oxo- $\beta$ -karotin) (7. ábra). A sejtekben található karotinoid molekulák neutrálisak – mint pl. a  $\beta$ -karotin (8. ábra) - vagy hidrofил csoportot tartalmaznak az egyik végükön, mint az echinenon - vagy mindkét végükön – mint a zeaxantin és a myxoxantofill. Azok a molekulák, amelyek mindkét végükön tartalmaznak hidrofил csoportot, azok rigidizáló hatást képesek a membránra kifejteni (5. ábra).

A *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsben a xantofill szint növekedését az alacsony hőmérséklet és magas fényintenzitás egyaránt indukálja. Ezért is fontos figyelembe venni a myxoxantofill membrán szerkezetet befolyásoló szerepét. Mivel ebben a xantofill molekulában a hidroxil csoporton kívül egy cukor csoport (ramnóz) is van, ez tovább erősítheti a membránstruktúrát merevítő hatást (5. ábra). Az alacsony hőmérsékletre történő adaptáció szempontjából, ami egyébként egy fluidabb membránszerkezetet igényelne, ez a „kedvezőtlen” struktúra rigidizáló hatással van.

Összehasonlítottuk a 25°C-on és a 35°C-on, 0.04 illetve 0.2 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitáson nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekből izolált tilakoid membránok klorofill tartalmát és karotinoid összetételét.

A xantofillok relatív mennyisége magasabb volt azokban a sejtekben, amelyek 25°C-on szaporodtak, mint a 35°C-on nevelt sejtek tilakoid membránjában (4. táblázat). A  $\beta$ -karotin tartalom számottevően magasabb volt azokban a tilakoid membránokban, amelyek a 35°C-on nevelt sejtekből lettek izolálva. A myxoxantofill relatív mennyisége meglepő módon változott. Amikor a nevelési hőmérséklet 35°C-ról 25°C-ra csökkent, akkor a tilakoid membránok relatív myxoxantofill koncentrációja 30 %-ról 44%-ra nőtt. A zeaxantin és az echinenon koncentrációját nem befolyásolta lényegesen a sejtek nevelési hőmérséklete.

A klorofillra normalizált eredmények szerint a fény intenzitásának emelésével a relatív karotinoid tartalom nő. A myxoxantofill mennyisége jelentősen megnőtt azoknak a sejteknek a tilakoid membránjában amelyek 35°C-on szaporodtak, ez a változás kisebb mértékű volt a 25°C-on nevelt sejtek esetében. 35°C-on klorofillhoz viszonyított myxoxantofill tartalom 31 % volt 0.2 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitás mellett, míg 0.04 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fényintenzitáson nevelt sejtekben 11 %-ot tudtunk kimutatni. 25°C-

on a myxoxantofill klorofillhoz viszonyított mennyisége a fény intenzitásának növekedésével 22%-ról 46%-ra nő. A kísérletek során az epoxidok mennyiségének a növekedése is megfigyelhető volt a fény intenzitásának a növekedésével.

4. táblázat: A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekből izolált tilakoid membrán (TM) klorofill-a -ra normált és relatív % -os karotinoid összetétele

Nevelési hőmérséklet (°C)	Fényintenzitás (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Klorofill-a (ng/g TM)	Σkar/kl-a (mol%)	karotinoid összetétel (rel%) (karotinoid/klorofill-a (mol%))				rigid/ neutrális arány
				β-karotin	echinenon	zeaxantin	myxoxanto.	
25	0.04	92.3	50.8	16 (8.3)	39 (19.7)	1 (0.6)	44 (22.2)	2.75
35	0.04	152.8	37.1	30 (11.4)	38 (14.0)	2 (0.6)	30 (11.1)	1.00
25	0.2	58.6	126.3	18 (23.1)	44 (55.5)	1 (1.0)	37 (46.7)	2.02
35	0.2	47.4	110.0	30 (32.7)	40 (44.1)	2 (2.1)	28 (31.1)	0.93

Rigid/neutrális arány: myxoxantofill/β-karotin, Gruszczyński (1999) alapján.

Σkar/kl-a (mol%): összkarotinoid/klorofill-a (mol%)

Az táblázat három független kísérlet eredményeinek átlagait tartalmazza, a szórás az értékek ±5%-a volt.

Ennek a törzsnek a karotinoid összetételét vizsgálva, összefüggést állapíthatunk meg a különböző fényintenzitás és nevelési hőmérséklet hatására bekövetkezett membránszerkezet változások és a lipid telítetlenség illetve a pigment összetétel között.

A membrán homeoviszkozus adaptációját vizsgálva kimutatták, hogy bár a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben igen nagy mértékben változik a zsírsavak telítetlensége a nevelési hőmérséklet függvényében, az izolált tilakoid membránok rotációs korellációs idő görbáját összehasonlítva nem látnak különbséget, vagyis a membrán nem válik fluidabbá (Fodor, PhD Thesis, (2000) 59. oldal Fig I. 5.). A



karotinoid összetétel változásának vizsgálata magyarázattal szolgálhat arra - az eddigi elméleteknek látszólag ellentmondó - tényre, hogy ezeknek a pigmenteknek a jelenléte kompenzálni képes a lipid telítetlenség hatásaként fellépő membrán fluidizáló hatást.

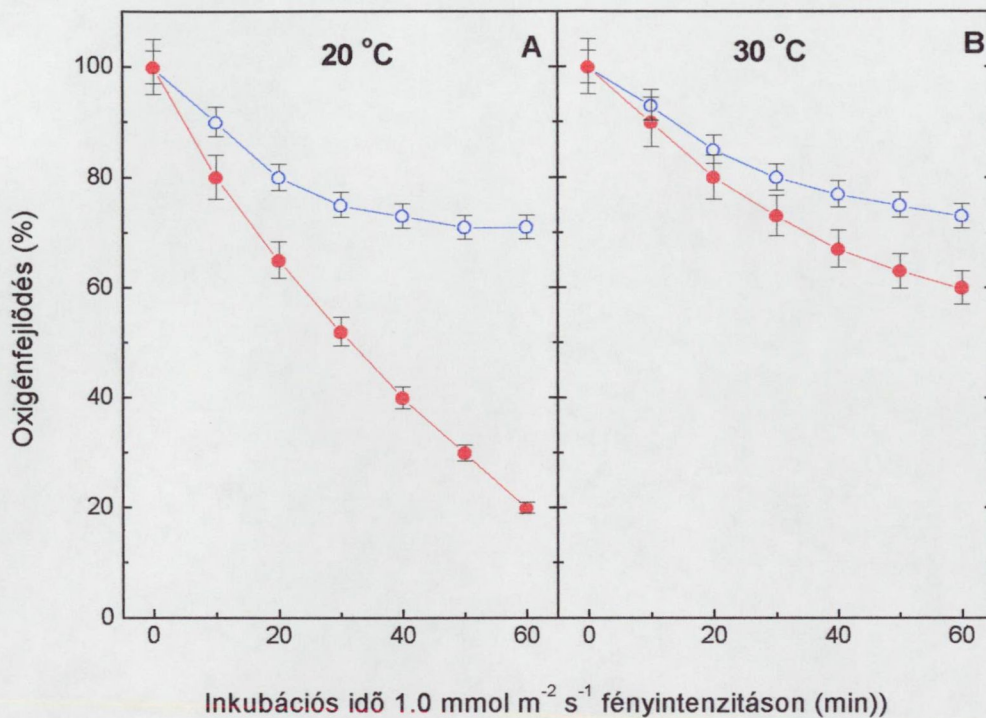
A karotinoidok szerepét a *Cylindrospermopsis raciborskii*-ban a jövőben FTIR technikát alkalmazva kívánjuk vizsgálni. A *Cylindrospermopsis raciborskii* rendkívül nagy karotinoid összetétel változásai miatt jó objektum lehet a membrán fluiditás sokrétű szabályozásának igazolására. Bár a kísérletek még csak kezdeti stádiumban vannak, az eddigi eredmények alátámasztják megállapításainkat.

#### 4.5. A *Cylindrospermopsis raciborskii* alacsonyhőmérsékletű fotoinhibíciója

Azért, hogy a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek biokémiai jellemzői és élettani tulajdonságai közötti összefüggésekre magyarázatot találjunk megvizsgáltam a sejtek fényátlással szembeni viselkedését.

A 25°C-on és 35°C nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejteket nagy fényintenzitású,  $1.0 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fénnel világítottuk meg. Ezt követően megmértük a sejtek PSII aktivitásának csökkenését úgy, hogy elektron akceptorként 1,4-benzokinont alkalmaztunk. Mind a 25°C-on, mind a 35°C-on nevelt sejtekben lecsökkent a PSII aktivitás, függetlenül attól, hogy a fotoinhibíciós kezelés 20°C-on vagy 30°C-on történt. Megfigyelhettük, hogy a 25°C-on nevelt sejtek fotoszintetikus aktivitása sokkal kisebb mértékben csökkent a nagy fényintenzitás alkalmazása mellett, mint a 35°C-on nevelteké. A különbség még kifejezettebb volt amikor a mérést 20°C-on végeztük (15A. ábra), összehasonlítva a 30°C-on végzett méréssel (15B. ábra). Mind a két hőmérsékleten nevelt sejt érzékenyebben reagált a fénykezelésre 20°C-on, mint 30°C-on.

Összehasonlítva ezeket az adatokat a 25°C-on ill. 35°C-on nevelt *Synechocystis* PCC6803 sejtek PSII aktivitásával hasonló kezelések után, megállapítottuk, hogy a *Synechocystis* sejtek lényegesen kisebb érzékenységgel reagáltak a fotoinhibícióra. A *C. raciborskii* sejtek különösen stressz rezisztensnek bizonyultak a természetes környezetben is előforduló hőmérsékleti és fényintenzitás értékek alkalmazása esetében. A *Synechocystis* sejtek hasonlóan nagyobb fotoinhibíciós érzékenységet mutattak alacsonyabb hőmérsékleten, de ezt az érzékenységet nem befolyásolta a nevelési hőmérséklet.



15. ábra: 25°C-on (—○—) és 35°C-on (—●—) 0.04 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fényintenzitáson nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek fotoinhibíciója 20°C-on (A) és 30°C-on (B) 1.0 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fényintenzitáson. A fotoszintetikus aktivitást 30°C-on az oxigénfejlődés mérésével követtük. A fénygátlás előtt az oxigénfejlesztés értéke (100%) a 25°C-on nevelt *C. raciborskii* sejtek esetében 390 ± 10 μmol O<sub>2</sub>/mg klorofill/óra, a 35°C-on nevelt sejteknél pedig 360 ± 10 μmol O<sub>2</sub>/mg klorofill/óra volt. Az ábrán három egymástól független kísérlet eredményeinek átlaga és szórása szerepel.

A fotoinhibíciós méréseink azt mutatják, hogy a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek fénygátlása függ a nevelési hőmérséklettől, ellentétben a *Synechocystis* sejtekkel, ahol a nevelési hőmérséklet nem befolyásolta a fotoinhibíció mértékét. Az, hogy a fotoinhibíció azokban a *C. raciborskii* sejtekben, amelyek magasabb hőmérsékleten szaporodtak nagyobb mértékű volt, mint azokban, amelyek alacsonyabb hőmérsékleten, összefüggésbe hozható azzal a ténnyel, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten nevelt sejtekben a többszörösen telítetlen glicerolipid komponensek nagyobb koncentrációban vannak jelen. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a többszörösen telítetlen lipid

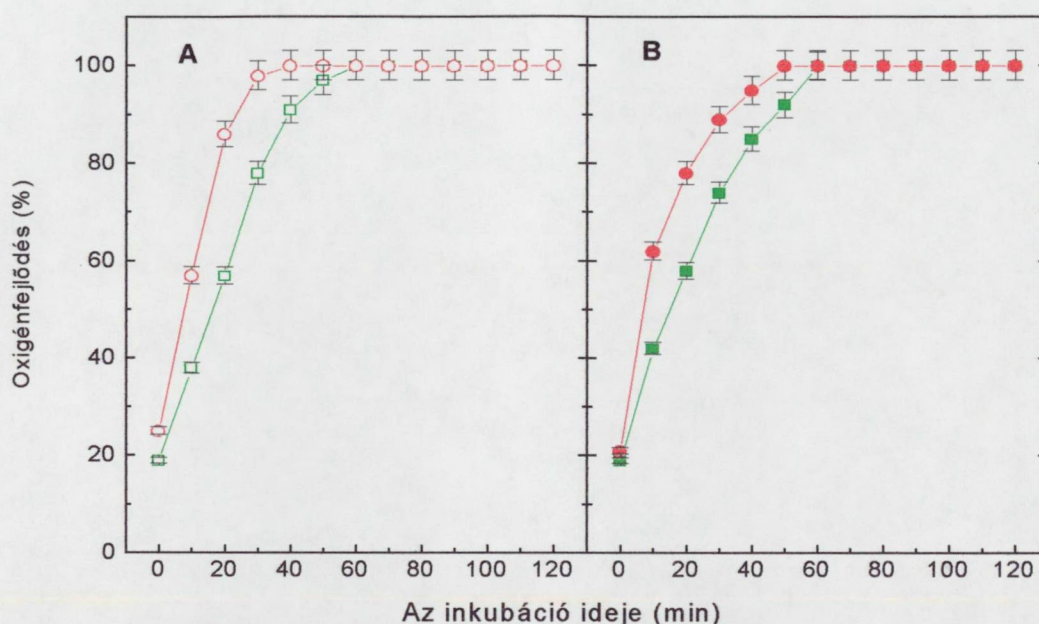
molekulák mennyisége és a sejteknek azon tulajdonsága között, hogy milyen mértékben képesek a PSII komplexet megvédeni az alacsony hőmérsékletű fotoinhibíció okozta károsodásoktól szoros korelláció van. A lipidmutásokon korábban végzett kísérletek igazolták, hogy a fotoszintetikus membránok zsírsavainak telítetlensége összefüggésbe hozható az alacsony hőmérsékleten jelentkező fénygátlással szembeni ellenállóképességgel (Tasaka és mtsai., 1996; Gombos és mtsai., 1992; 1994) A fotoinhibíció és az ezt követő regeneráció összefüggésben van a PSII komplexben található D1 fehérje degradációjával és a fehérje *de novo* szintézisét követő visszaépülésével a komplexbe. A D1 fehérje a lipid membránban van beágyazódva, így a prekursor D1 beépülését, illetve a fehérje aktív formájának a kialakítását a proteináz enzim által, nagy mértékben befolyásolni képes a lipid környezet minősége (Kanervo és mtsai., 1997).

További lépésként összehasonlítottuk a PSII komplex fotoszintetikus aktivitásának a visszaállását a fotoinhibíció után a két törzsben. A 25°C-on és 35°C-on nevelt sejteket kezeltük 20°C-on, 40 percig  $2.0 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  erősségű fénnel, ami kb. 75%-os aktivitás veszteséget eredményezett. Ezután a sejteket alacsony fényintenzitáson,  $0.04 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -on, inkubáltuk 20, illetve 30°C-on.

30°C-on (16. ábra) mindkét törzsben teljes volt a fotoszintetikus apparátus működésének helyreállása, a sejtek visszanyerték a fotoszintetikus aktivitásuk 100%-át. Azok a *C. raciborskii* sejtek amelyeknek a nevelési hőmérséklete 25°C volt, 40 perc alatt nyerték vissza a teljes fotoszintetikus aktivitásukat, az ugyanilyen körülmények között nevelt *Synechocystis* PCC6803 sejtekben 60 perc alatt állt vissza az aktivitás a 100%-ra (16A. ábra).



Ha a sejteket 35°C-on neveltük, akkor a fotoinhibíció után, 30°C-on a *C. raciborskii* sejtek 50 perc alatt, míg a *Synechocystis* sejtek 60 perc alatt nyerték vissza a fotoszintetikus aktivitásuk 100%-át (16B. ábra).

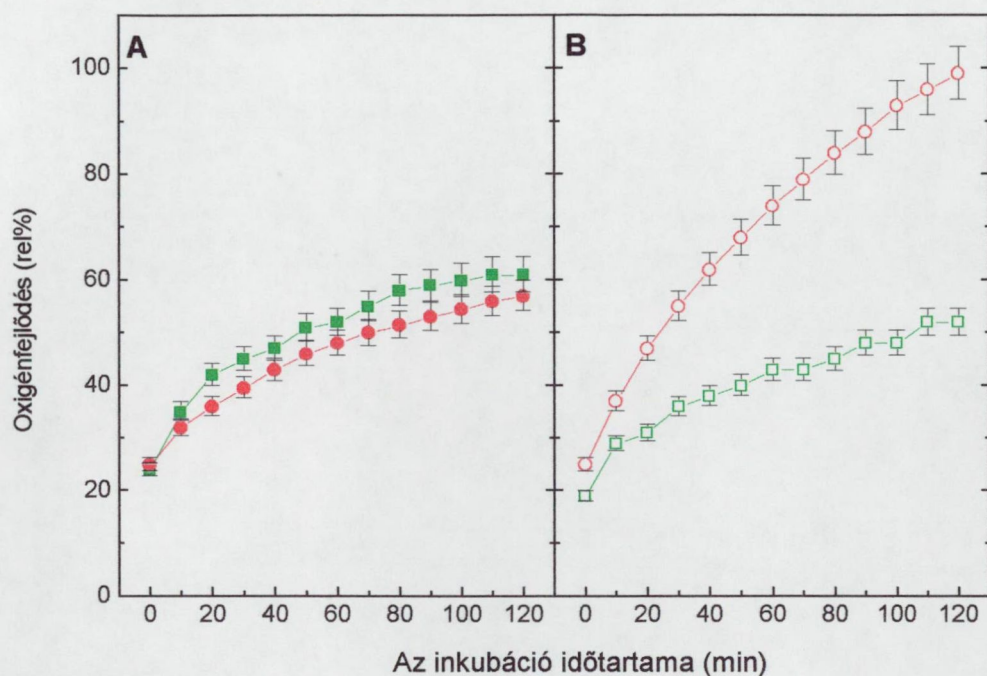


16. ábra: *Synechocystis* PCC6803 (□, ■) és *C. raciborskii* (○, ●) sejtek PSII aktivitásának fotoinhibíció utáni visszaállása 30°C-on, 0.04 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fényintenzitáson. A sejtek 25°C-on (A), vagy 35°C-on (B) szaporodtak. Az oxigénfejlődés méréshez 1 mM 1,4-benzokinont használtunk elektron akceptorként. A 100% oxigénfejlődés a 25°C-on ill. a 35°C-on nevelt *Synechocystis* sejtek esetében 480 ± 20 és 440 ± 15 μmol O<sub>2</sub>/mg klorofill/óra volt, a 25°C és 35°C-on nevelt *C. raciborskii* sejtek esetében 390 ± 10 és 360 ± 10 μmol O<sub>2</sub>/mg klorofill/óra értéket kaptunk. Az ábrán három egymástól független kísérlet átlagai és szórásai szerepelnek.

Ezek az eredmények újabb bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a többszörösen telítetlen lipidek a PSII reakciócentrum fénygátlás során bekövetkező károsodása után történő helyreállításban játszanak szerepet (Tasaka és mtsai, 1996).

Az előzőekkel ellentétben, a 35°C-on nevelt sejtek 20°C-on nem voltak képesek fotoszintetikus aktivitásukat teljes mértékben visszanyerni. Amint azt a 17A. ábra mutatja erre sem a *Synechocystis* PCC6803 sem pedig a *C. raciborskii* sejtek nem voltak képesek.





17. ábra: *Synechocystis* PCC6803 (—□—, —■—) és *C. raciborskii* (—○—, —●—) sejtek PSII aktivitásának fotoinhibíció utáni visszaállása 20°C-on, 0.04 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fényintenzitáson. A sejtek 35°C-on (A), vagy 25°C-on (B) szaporodtak. Egyéb körülmények, mint a 16. ábrán.

A két törzs között meglepően nagy különbség mutatkozott akkor, ha a nevelési hőmérséklet 25°C volt (17B. ábra). Ekkor a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejteknél a PSII aktivitásának visszaállása két óra alatt lezajlott, míg a hasonlóan kezelt *Synechocystis* PCC6803 sejtek ugyanennyi idő alatt aktivitásuknak csak 40%-át nyerték vissza.

Összegezve tehát azt mondhatjuk, hogy a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben a PSII fotoinhibíció utáni regenerálódási képességének függése a nevelési hőmérséklettől összefüggésbe hozható a a fotoszintetikus membránban található glicerolipidek telítetlenségi szintjének változásával. A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben az alacsonyabb nevelési hőmérsékleteken a többszörös kettős kötést

tartalmazó zsírsavak szintézise elősegíti a PSII aktivitásának a fotóinhibíció utáni visszaállítását. Ezzel összhangban vannak a zsírsav analízis eredményei is, amik azt mutatják, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyiségének a változása a nevelési hőmérséklet függvényében vizsgálva sokkal nagyobb mértékű volt a *C. raciborskii* sejtekben, mint a *Synechocystis* PCC6803 sejtekben. Ezek a kísérletek azt is bizonyítják, hogy a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek képesek alkalmazkodni a környezeti stresszhez, azáltal, hogy megváltoztatják a membrán alkotó lipidjeik telítettségi fokát és ez nagy mértékben befolyásolja az alacsony hőmérsékletű fotóinhibícióval szembeni védelem fokát. Eredményeink tovább erősítik a többszörösen telítetlen glicerolipidek jelenlétének különösen fontos szerepére a fotóinhibíció utáni regenerációs folyamatokban, amelyek során a fotoszintetizáló organizmusok képesek fotoszintetikus aktivitásukat visszanyerni.

#### **4.6. A foszfatidilglicerol szerepe az elektrontranszportban**

##### **4.6.1. *pgsA* mutáns *Synechocystis* PCC6803 előállítása**

A membránszerkezet egészét befolyásoló tényezőkön kívül az egyes lipidek specifikus lipid-fehérje kölcsönhatása is fontos szerepet tölt be a sejtek élettani folyamataiban. A cianobakteriális tilakoid membránban jelenlevő lipidek közül a foszfatidilglicerol szerepét vizsgáltuk. A korábbiaktól eltérően egy új kísérleti stratégiát követtünk. Transzformálható *Synechocystis* PCC6803 sejtekben inaktiváltuk a foszfatidilglicerolfoszfát szintetáz enzimet kódoló gént (*pgsA*) egy antibiotikum rezisztenciát kódoló gén inszerciójával. Az így kapott mutáns sejtek PG auxotrófnak bizonyultak. Kizárólagosan kívülről adagolt PG jelenlétében voltak képesek osztódni. A külső PG koncentráció változtatásával lehetőségünk nyílt a sejten belüli PG szint változtatására. Ez a kísérleti elrendezés lehetőséget nyújtott arra, hogy az egyéb sejtalkotók változatlanul hagyása mellett a PG fiziológiás jelentőségét tanulmányozhassuk.

##### **4.4.2. A PG tartalom változása**

A *pgsA* mutáns sejteket PG nélküli tápoldatban nevelve elértük azt, hogy a sejtek 6 nap után eredeti PG tartalmuk 80%-át elveszítették. Az eredetileg jelenlévő  $3.3 \text{ nmol}/10^8$  sejt PG tartalom  $0.55 \text{ nmol}/10^8$  sejtre csökkent. Ez a változás együttjárt a sejtek fotoszintetikus oxigén fejlesztő képességének jelentős csökkenésével. Ez a megfigyelés indokolta a fotoszintetikus, membránkötött elektrontranszport folyamatok részletesebb felderítését és a PG szerepének tisztázását.



## 4.4.3. A PG szint csökkenésének hatása a PSI aktivitására

A PSI aktivitását fény hatására bekövetkező abszorpcióváltozás mérésével végeztük. Egész sejteken mértük a PSI reakciócentrumok fényindukált oxidációját illetve sötétben történő redukcióját (5. táblázat).

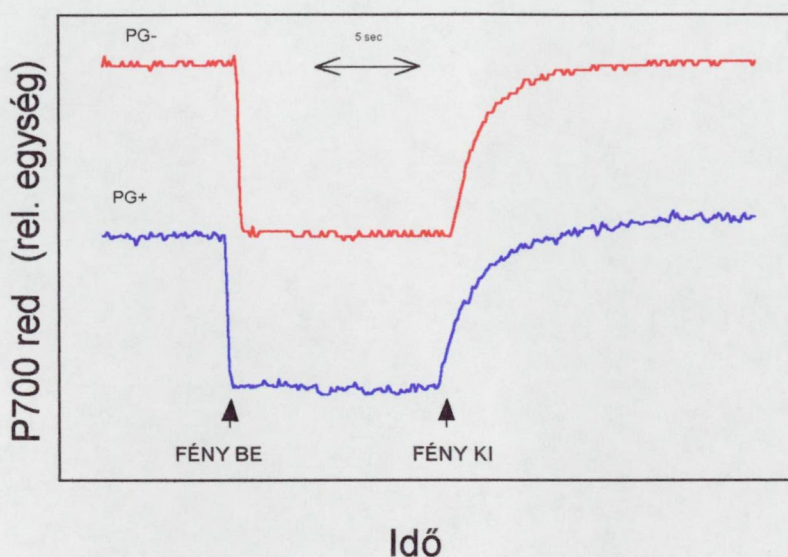
5. táblázat: 6 napos PG éheztetett és PG tartalmú táptalajon nevelt *pgsA<sup>-</sup>* mutáns *Synechocystis* sejtekben a P700 fényindukált redox változásai, 820 nm-nél mért abszorpcióváltozás alapján.

	az oxidáció sebessége (mV/s $10^{-3}$ )	a redukció sebessége (mV/s $10^{-5}$ )	Az oxidált P700 mennyisége rel. egység (mV)
PG <sup>-</sup> , 6 nap	$-6.52 \pm 0.69$	$6.08 \pm 0.87$	$14.30 \pm 1.51$
PG <sup>+</sup> , 6 nap	$-8.05 \pm 0.67$	$6.98 \pm 0.69$	$13.77 \pm 0.50$

Az adatok relatív mértékegységekben vannak megadva, azonos klorofill tartalomra normálva.

A méréseket 6 napos PG éheztetett sejteken végeztük (18. ábra). Összehasonlítva az abszorpció változásokat PG jelenlétében illetve PG nélkül nevelt sejtekben láthatjuk, hogy az oxidáció és a redukció sebessége szignifikánsan nem függött a PG sejten belüli mennyiségétől. Az általunk használt mérési technikával nem tudtunk kimutatni számottevő eltérést a kétféle módon nevelt sejt P700 aktivitásában.

E kísérletek alapján, arra a következtetésre jutottunk, hogy a PG molekulák membránból való eltávolítása nem befolyásolja lényegesen a PSI aktivitást, ami azt jelenti, hogy a P700 környezetében valószínűleg nincsenek olyan kötött PG molekulák amelyek eszenciális szerepet töltenek be.

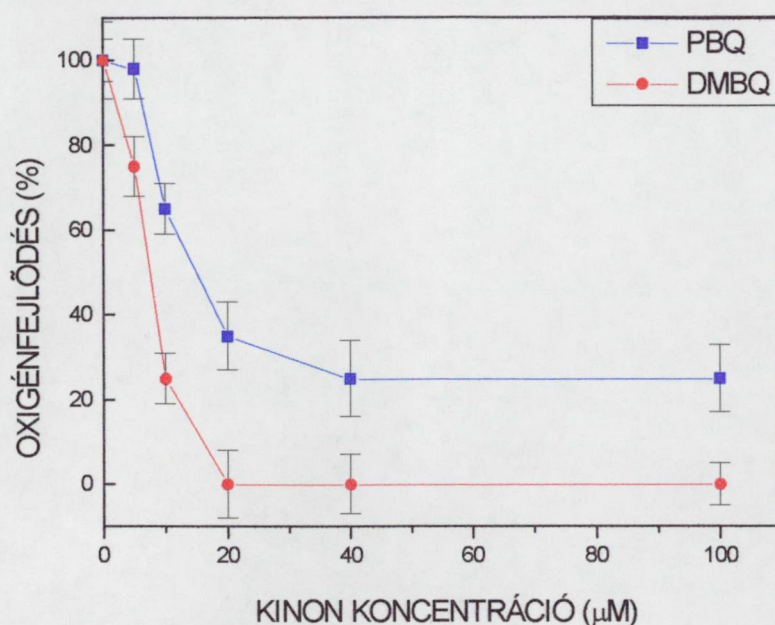


18. ábra: A P700 fényindukált redox változásának követése a 820 nm-es abszorpció változással. A méréseket 10  $\mu\text{M}$  DCMU és 50 mM metilviologén jelenlétében végeztük.

#### 4.4.4. Mesterséges kinonok hatása a fotoszintetikus oxigén fejlődésre

A PSII aktivitást mesterséges kinonokkal, mint elektron akceptorokkal mérhetjük. Cianobaktériumokban mesterséges kinonok, mint például para-benzokinon (pBQ) és halogénezett, illetve metilezett származékai jelenlétében mérhető oxigén fejlődés mindig nagyobb értéket mutat, mint ami a természetes terminális akceptorral, a széndioxiddal mérhető. A *pgsA*<sup>-</sup> mutáns esetében azonban, ha a sejteket PG nélkül neveltük a kinonok gátló hatást fejtettek ki (19. ábra). A gátlást már három napos PG éheztetés után is észleltük. A PG sejtben belüli szintjének csökkenésével ez a hatás fokozódott. Hat napos éhezés után a teljes gátlás 400  $\mu\text{M}$ -os pBQ koncentrációnál jelentkezett, a dimetil-pBQ esetében pedig már 20  $\mu\text{mol}$ -nál (19. ábra).





19. ábra PG nélkül nevelt *pgsA* mutáns *Synechocystis* sejtek oxigén fejlesztése kinonok jelenlétében. (Magyarázat a szövegben.)

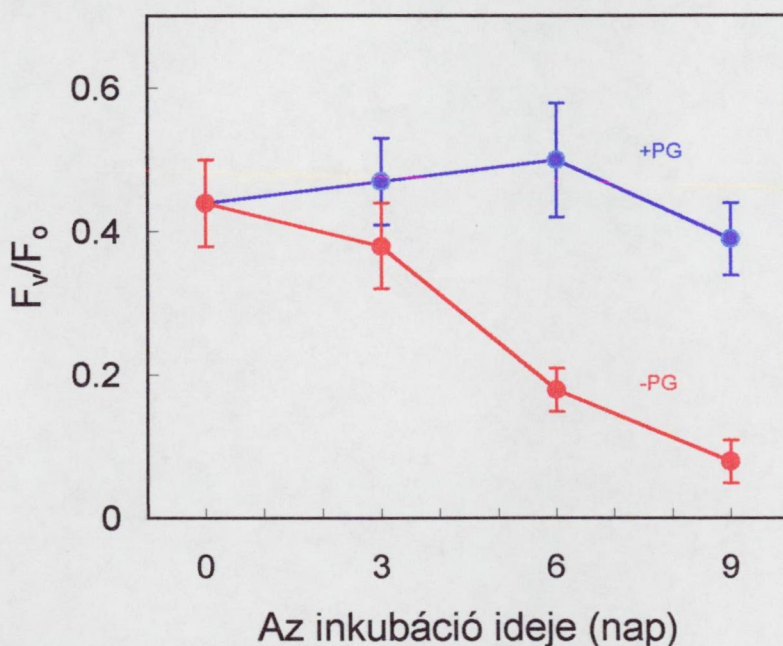
Ezek az adatok azt mutatják, hogy a  $Q_A$  és/vagy a  $Q_B$  környezete a PG eltávolításának következményeként olyan változáson megy keresztül, ami funkcionális zavarokat eredményez. Feltételezzük, hogy a kinon kötőhely struktúrája megváltozik, ha a PG sejten belüli koncentrációja lecsökken, a kinonok kötődésének erőssége nő, a kinonok fel- és lekötődése gátlódik, irreverzibilissé válik.

#### 4.4.5. A PS II aktivitás mérése fluoreszcencia indukcióval

A kinonok gátló hatása miatt oxigén fejlődés alapján nem tudtam a PSII aktivitásának PG függő változását követni, ezért fluoreszcencia indukció mérést választottam a PSII aktivitásának meghatározására. A cianobaktérium sejteken mérhető fluoreszcencia indukciós paraméterek, a fluoreszcencia maximum ( $F_m$ ) és a klorofillból származó alap fluoreszcencia hozam ( $F_0$ ), segítségével jellemezhetjük a  $Q_A$  oxidáltsági állapotát, ami a PSII aktivitással áll kapcsolatban. Az  $F_m - F_0$  megadja a fluoreszcencia változó részét ( $F_v$ ). Algák és cianobaktériumok esetében a 0.5-2 másodperces



fénypulzusok sorozata, ami magasabbrendű növények esetében általánosan használatos, nem-fotokémiai kioltást okozhat, ezáltal az  $F_m$  értékeket csökkentheti (Schreiber és mtsai, 1995). Ez a hatás, az általunk alkalmazott egyetlen fénypulzus alatt elhanyagolható, amit az is igazol, hogy az így mért  $F_m$  értéke megegyezett a DCMU jelenlétében, alacsonyabb intenzitású aktinikus fénnel meghatározott  $F_m$  értékével. A fluoreszcenciában bekövetkező változásokat cianobaktériumoknál az  $F_0$ -ra normált  $F_v$  értékekkel jellemezhetjük (Ermakova-Gerdes és Vermaas, 1998).



20. ábra: PSII aktivitás mérése fluoreszcencia indukcióval PG jelenlétében és PG nélkül nevelt *pgsA*<sup>-</sup> mutáns *Synechocystis* sejtekben. (Magyarázat a szövegben.)

A méréseink azt mutatják, hogy a PG sejten belüli koncentrációjának a csökkenésével párhuzamosan - kilenc napos PG éhezést követően - a kezdeti  $0.5 F_v/F_0$  érték  $0.08$ -ra csökkent (20. ábra). Ez a változás azt sugallja, hogy a PSII aktivitása drámai mértékben csökken. Ez egy újabb bizonyítékát szolgáltatja annak, hogy a PG hiány jelentősen befolyásolja a PSII aktivitását.

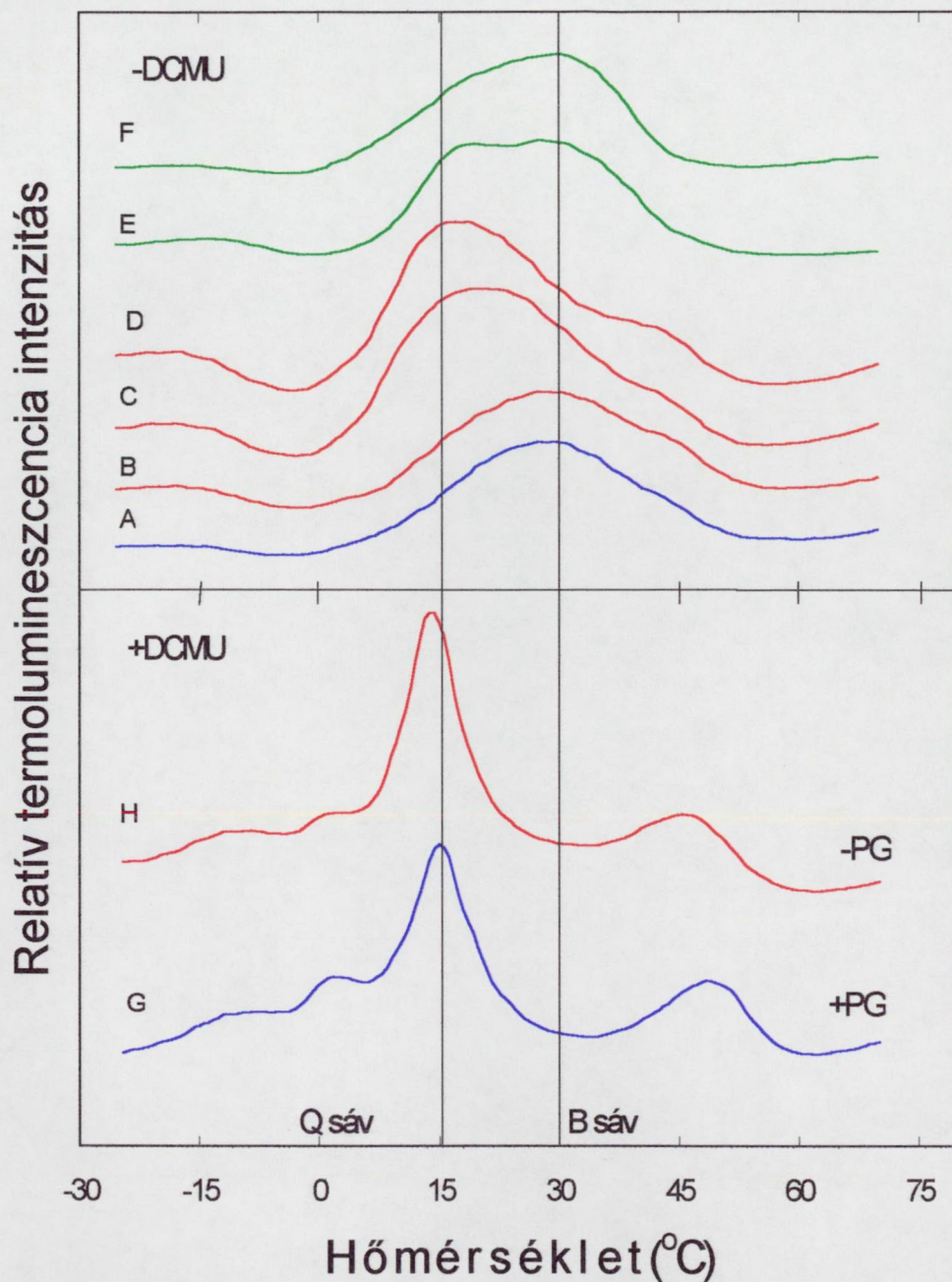
4.4.6. A fotoszintetikus elektrontranszport jellemzése a termolumineszcencia mérések segítségével

Az elővilágított minta melegítése során bekövetkező fénykibocsátást termolumineszcenciának (TL) nevezzük. Az előmegvilágítás során a PSII reakciócentrumában a pozitív és negatív töltések szétválnak és az elektrontranszport lánc különböző komponensein tárolódnak. Melegítés hatására ezek a töltések fénykibocsátás mellett rekombinálódhatnak. Attól függően, hogy mely akceptorok és donorok vesznek részt a rekombinációban, a TL görbék maximumai különböző hőmérsékleteken jelennek meg.

A vízbontó komplex  $S_2$  állapotában tárolt pozitív töltés és a PSII másodlagos kinon akceptorából, a  $Q_B$ -ből származó elektron rekombinációja során az u.n. B sáv figyelhető meg. Ha az  $S_2^+$  a  $Q_B$ -nél alacsonyabb redox állapotú  $Q_A$ -ból származó elektronnal rekombinálódik, akkor a B sávhoz képest alacsonyabb hőmérsékleten megjelenő sávot látunk, míg a tirozin  $D^+$  és a  $Q_A^-$  rekombinációjából származó C sáv magasabb hőmérsékleten jelenik meg (Demeter és mtsai, 1993).

A TL lehetőséget biztosít az egyes elektrontranszport lépések között fellépő gátlás felderítésére. Ezzel a módszerrel követtük a PG jelenlétében vagy annak hiányában nőtt *pgsA* mutáns sejtek termolumineszcenciáját (21. ábra). PG jelenlétében nőtt sejtekben 27°C-nál jelentkezett a B sáv, mely sáv az  $S_2Q_B$ - töltés rekombinációból ered (21. ábra A görbe). Ez alapján megállapíthattam, hogy az elektronok az elektrontranszportlánc  $Q_B$  tagjáig zavartalanul eljutnak. 10  $\mu$ M DCMU jelenlétében, amikor a  $Q_A$ - $Q_B$  átmenet gátolt, a Q sáv 15°C-nál jelenik meg (21. ábra G és H görbe).





21. ábra: A *psgA* mutáns *Synechocystis* sejtek termolumineszcencia görbéi DCMU jelenlétében és DCMU nélkül.

PG jelenlétében nőtt sejtek: **A** —

PG mentes tápoldatban nevelt sejtek: **B** — 3 nap; **C** — 6 nap; **D** — 9 nap

9 napig PG mentesen nevelt sejtek visszahelyezve PG tartalmú táptalajba: **E** — 3 nap; **F** — 9 nap

PG jelenlétében nőtt sejtek 10  $\mu$ M DCMU jelenlétében mérve: **G** —

9 napig PG mentesen nevelt sejtek 10  $\mu$ M DCMU jelenlétében mérve: **H** —

Ha a *pgsA*<sup>-</sup> mutáns sejtekből fokozatosan eltávolítjuk a PG-t úgy, hogy PG nélküli tápoldatban neveljük a sejteket, akkor a B sáv fokozatosan alacsonyabb hőmérsékletre tolódik (21. ábra B és C görbék). Kilenc napos PG mentes táptalajon való nevelés után ez az érték 17°C-ra tolódott (21. ábra D görbe). A PG-nek a sejtekhez történő visszaadása után a sáv fokozatosan visszatolódott az eredeti B sáv hőmérsékleti pozíciójához (21. ábra E és F görbe). Ahhoz, hogy felderítsük a 17°C-os sáv eredetét a sejteket DCMU-val kezeltük. A Q sáv pozíciója megegyezett a PG hiányos *pgsA* mutáns sejtek termolumineszcenciás görbéjén megjelenő sáv pozíciójával. Ez az eredmény azt jelenti, hogy a PG hiányában a sejtek elektrontranszportja sérül. A PG hiány hatására az elektronok a Q<sub>A</sub> környezetében halmozódnak fel és az elektronok továbbfolyása gátolt. Megfigyelhettük még azt is, hogy a Q sáv megjelenése együttjárt a C sáv megjelenésével 42°C-nál, ami D<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> töltés rekombinációnak felel meg.

Összegezve, megállapítottuk, hogy a foszfatidilglicerol eltünése a sejtekből a fotoszintetikus elektrontranszport komoly zavarával párosul. A hatást a Q<sub>A</sub>-Q<sub>B</sub> elektrontranszport környezetében lokalizáltuk. Elsők között határoztuk meg *in vivo* a PG fotoszintézisben betöltött meghatározó szerepét és szerkezeti fontosságát.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az értekezés legfontosabb eredményeit a következőkben foglalom össze:

- I. Megállapítottam, hogy *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben a fotoszintetikus elektrontranszport aktivitás hőmérsékleti optimuma függ a sejtek nevelési hőmérsékletétől. A 25°C-on nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben ez az érték 28°C-nak, míg a 35°C-on nevelt sejtek esetén ez az érték 36°C-nak adódott. A hasonló körülmények közt nevelt *Synechocystis* PCC6803 sejtek esetében a maximális aktivitás értéke nem mutatott ilyen mértékű eltérést (Várkonyi és mtsai, 1998, in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Vol:3 pp1819-1822).
- II. A cianobaktérium sejtek membránjaiban, amint azt korábban *Synechocystis* PCC6803 és *Synechococcus* PCC7942 sejteken megállapítottuk, a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége emelkedik alacsony nevelési hőmérsékleten (Gombos és mtsai, 1996, *Biochim. Biophys. Acta* 1299:117-124; Várkonyi és mtsai, 1996, *J. Sci. & Ind. Res.* 55:658-668), amely indukálja a többszörösen telítetlen zsírsavak szintézisét. A telítetlen zsírsavak mennyiségének nevelési hőmérséklettől függő változásai a *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben meghaladja a korábban más cianobaktériumok esetében mért szintet. Ez az indukció nem változik a <sup>nevelési</sup> fényintenzitás függvényében. 25°C-on nevelt sejtekben a telítetlen/telített zsírsavak aránya a *Cylindrospermopsis raciborskii* esetében jelentősen meghaladja a *Synechocystis* PCC6803 sejteknél mérhető arányt, ez



megfigyelhető a DBI (double bond index, kettős kötés index) értékeinél is (Várkonyi és mtsai, 2000, Biochemical Society Transactions 28: 894-897).

- III. Megállapítottam, hogy a xantofillok mennyisége a fényintenzitás növekedésével nő. A xantofillok relatív mennyiségének növekedése a hőmérséklet csökkentésével is indukálhatónak bizonyult. A *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben négy karotinoid molekulát azonosítottam:  $\beta$ -karotint, echinenont, zeaxantint és myxoxantofillt. A fény intenzitásának növekedésével a klorofillhoz viszonyított karotinoid tartalom nő. A hőmérséklet csökkentésével pedig a xantofillok, különösen a myxoxantofill relatív mennyisége emelkedett meg. Tudomásom szerint ezideig az alacsony hőmérséklet nem szerepelt a xantofillok szintézisét indukáló hatások között. Megállapítottuk, hogy a karotinoid összetétel változása képes kompenzálni az alacsony hőmérsékleten a zsírsavak telítetlenségi fokában bekövetkezett növekedés hatásaként fellépő membrán fluidizáló hatást. Ezen adatok – és más itt nem részletezett FTIR és ESR mérési eredmények – alapján valószínűsítettük a mikroviszkozitás karotinoidokkal való szabályozhatóságát natív membránokban.
- IV. Kísérleteim alapján megállapítottam, hogy alacsony hőmérsékleten (20°C-on) a *C. raciborskii* sejtek fénygátlással szembeni ellenállóképessége jelentősen eltér más, általunk vizsgált cianobaktérium sejtektől (*Synechocystis* PCC6803, *Synechococcus* PCC7942) (Gombos és mtsai., 1999, in The Phototrophic Prokaryotes, pp 647-655; Várkonyi és mtsai., 2000, I.J.B.B. on „Photosynthesis Research in Postgenomic Era” in press). Meghatároztam, hogy a megnövekedett

ellenállóképességet a sejtek fokozott regenerációs képessége eredményezi. Feltételezzük, hogy ez a fotoszintetikus membrán lipidjeit észterező zsírsavak telítetlenségi fokának változásával szoros korellációban áll.

- V. *pgsA* mutáns *Synechocystis*-t használva elsőként sikerült a PG tartalom irányított változtatását *in vivo* megoldani. Bebizonyítottam, hogy a PG szint csökkenése a PSII aktivitását csökkenti. Megállapítottam, hogy a PG sejten belüli koncentrációjának csökkenésekor a Q<sub>A</sub> és/vagy a Q<sub>B</sub> kinon kötőhelyek környezete változik meg, ami a fotoszintetikus aktivitás csökkenését eredményezi. Ugyanakkor a PSI aktivitása nem változik a PG mennyiségének csökkenésével. (Hagio és mtsai, 2000, Plant Physiology, 124:795-804; Gombos és mtsai, kéziratban).

Mindezek a kísérletek - melyeket cianobaktériumokon, mint egy modellrendszeren végeztünk el - és a kapott eredmények, reményeink szerint hosszútávon elvezethetnek olyan új, stressz rezisztens transzgenikus növények előállításához, melyek a környezetünkben előforduló stressz hatásokat, mint pl. a szélsőséges hőmérséklet és fényintenzitás, elviselik. Eredményeink választ adnak azokra a környezetvédelmi szempontból feltett, fontos kérdésekre is, hogy melyek azok a fotoszintetizáló organizmusok, amelyek az előbb említett környezeti tényezők változásainak hatására nagyobb fokú adaptációs képességüknek köszönhetően kiválasztódnak a többiek közül és elszaporodnak.

## SUMMARY

### ***1. Light and temperature adaptation of *Cylindrospermopsis raciborskii****

For my study I used *Cylindrospermopsis raciborskii* a nitrogen fixing filamentous, toxin producing cyanobacterial strain. It inhabits sub-tropic/tropic water bodies having optimal growth temperature above 25°C, but recently appeared in the temperate waters of Lake Balaton (Hungary). In order to understand its seasonal domination we investigated the effect of different light intensities and temperatures to the growth of *Cylindrospermopsis raciborskii* and characterised the lipid, fatty acid and pigment composition of its thylakoid membranes.

#### ***1. Lipid composition of *Cylindrospermopsis raciborskii* cells***

Four major lipid classes were identified: monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG), the major lipid component, digalactosyldiacylglycerol (DGDG), sulfolipid (SQDG), and phosphatidylglycerol (PG). The distribution of the individual lipids in the total lipid extract was similar to other cyanobacteria or thylakoids of higher plants. The growth temperature and the light intensity had no effect on the distribution of lipid classes.

#### ***2. Fatty acid composition of *Cylindrospermopsis raciborskii* cells.***

In *Cylindrospermopsis raciborskii* cells, similarly to the fatty-acid composition of *Synechocystis* cells the major fatty acid species were, in that order, palmitic, linoleic,  $\alpha$ -linolenic, oleic,  $\gamma$ -linolenic, stearic and octadecatetraenoic acids. This shows that, according to the mode of fatty-acid desaturation, similarly to *Synechocystis*, *C. raciborskii* can be classified as a strain belonging to group 4. As expected on lowering

the temperature simultaneously with a significant decrease in the saturated-to-unsaturated ratio (sat%/unsat%) of fatty acids, the double bond index increased. In particular upon lowering the growth temperature from 35°C to 25°C the level of polyunsaturated fatty acids increased dramatically from 34% to 53%. In contrast, in *Synechocystis* PCC6803, this increase was considerably smaller, from 32% to 34%. Further in *Cylindrospermopsis raciborskii*, with decreasing growth temperature the level of linoleic acid decreased from 19% to 2%, while the levels of  $\alpha$ -linolenic acid and octadecatetraenoic acid increased from 11% to 49%, whereas the changes were significantly smaller in *Synechocystis* PCC6803. These data show that the adaptive alteration in the fatty acid composition is remarkably higher in *C. raciborskii* than in *Synechocystis* PCC6803 cells.

### 3. Carotenoid composition of *Cylindrospermopsis raciborskii* cells.

We analyzed the carotenoid composition and chlorophyll content of isolated thylakoid membranes from cells grown at 25 and 35 °C under the light intensities of 0.04 and 0.2 mmol m<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>. By means of HPLC four carotenoid molecular species were identified in the thylakoid membranes:  $\beta$ -carotene, eichinenone (4-oxo- $\beta$ -carotene), zeaxanthin and myxoxanthophyll.

We have found that the amount of xanthophylls was considerably larger in the thylakoid from the cells grown at 25°C than at 35°C. When the growth temperature decreased from 35 to 25°C, the concentration of myxoxanthophyll relative to chlorophyll-*a*, increased from 11% to 22%.

Increase in the light intensity enhanced remarkably the level of myxoxanthophyll relative to chlorophyll-*a* in thylakoid membrane. When the cells were

grown at 25°C and at 35°C, these amounts were 22% and 47% in low light, and 11% and 31% in high light, respectively.

These results – together with some preliminary data– indicate that xanthophylls contribute to the regulation of membrane fluidity. To explain the fact, that the thylakoid membrane fluidity of *C. raciborskii* does not change according to the growth conditions we establish a correlation between the carotenoid composition which can compensate the fluidising effect of lipid unsaturation and the membrane structure of this strain.

#### 4. Photoinhibition of photosynthesis and its recovery

The inhibition of the activity of photosystem II of *C. raciborskii* cells was measured following a long term incubation of the cells grown at 25°C or 35°C at a light intensity of 1.0 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. The measurements were carried out by monitoring photosystem II mediated electron transport from H<sub>2</sub>O to 1,4-benzoquinone. Photoinhibition occurred in both cultures grown at 25°C and 35°C and at both temperatures of photoinhibitory treatment, i.e. at 20°C and 30°C. However, cells grown at 25°C were more tolerant to high light exposure than the cells grown at 35°C. The difference was more pronounced when measured at 20°C, than at 30°C. In contrast although *Synechocystis* cells also showed higher susceptibility to photoinhibition at lower temperatures, but it was not affected by the growth temperature.

Since the kinetics of inhibition of photosynthesis suggested that photoinhibition depended on the growth temperature for *C. raciborskii* but not for *Synechocystis* PCC 6803, we compared the recovery kinetics of photosystem II activity after photoinhibition in these two strains. The cells grown at 25°C and 35°C were preincubated in the light at 2.0 mmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> at 20°C for 40 min, which resulted in ~75%

photoinhibition. Then the cells were incubated in low light at 30°C or 20°C. At 30°C, cells of *C. raciborskii* and *Synechocystis* PCC6803 grown at 35°C and 25°C regained 100% of their original activity in 50 and 60 min, and 40 and 60 min, respectively. A striking difference was observed between the recovery capabilities of the two strains when cells were grown at 25°C. In *C. raciborskii*, the recovery of photosystem II was complete in 2 hours. In contrast, in *Synechocystis* PCC6803, only 40% of the original activity of photosystem II was recovered during the same time. In *C. raciborskii* the recovery also clearly depends on the temperature of growth. These findings can be understood by taking into account the regulation of the level of unsaturation of glycerolipids and their key role in the recovery of photosystem II activity after photoinhibition.

In summary, we investigated the physiological consequences of the altered growth temperatures in the adaptation to high light at low temperature. In the case of *Synechocystis* PCC6803 the growth temperature did not affect the tolerance to low-temperature photoinhibition. In *C. raciborskii*, a decrease in the growth temperature enhanced the tolerance to low-temperature photoinhibition. The results of fatty acid analyses revealed that the variations in the level of polyunsaturated glycerolipids of the thylakoid membranes as a function of growth temperature were much higher in *C. raciborskii* than *Synechocystis* PCC6803. These data show that in natural conditions the photosynthetic organisms can manipulate their tolerance to stress conditions by adjusting the lipid unsaturation; as demonstrated in this work, this influences significantly the degree of protection against low temperature photoinhibition. In particular, our data point to the importance of polyunsaturated glycerolipids in the recovery process after photoinhibition of photosynthesis.

## ***II. Investigation of the role of phosphatidylglycerol in photosynthesis in PsgA mutant of Synechocystis PCC6803***

Using a *psgA* mutant of *Synechocystis* sp. PCC6803, that was incapable of synthesizing PG, we manipulated the content of PG in thylakoid membranes.

### ***1. Deprivation of PG does not affect the activity of PSI***

Flash driven oxidation and subsequent dark reduction of the reaction center of PSI (P700) were measured in intact cells of the mutant grown in the presence or in the absence of PG for 6 days and compared the rate of light and dark induced changes in the absorbance. The rate of reduction and oxidation was the same. These results demonstrate that the deprivation of PG does not affect the activity of PSI.

### ***2. PSII electron transport is inhibited by artificial quinones***

We found that following a deprivation of PG from the thylakoid membranes of the mutant cells PSII electron transport is inhibited by artificial quinones that are usually used as electron acceptors. A similar phenomenon was observed when the D2 protein was mutated. It was interpreted as a consequence that the plastoquinone (PQ) binding to  $Q_A$  was effected and PQ can be replaced by artificial quinones, which have stronger binding affinity to  $Q_A$ . In the *psgA* mutant cells grown without PG the altered structure of the reaction center complex resulted in the change either in the binding affinity or the redox potential of the bond quinone and consequently both modification can block the electron flow. The binding affinity of these quinones might have changes due to the gradual elimination of PG, wich is suggested to be localized around  $Q_B$  pocket and the change result in the inhibition of PSII activity like DCMU.

### *3. Deprivation of PG result decrease of PSII activity*

We measured the change in stationary fluorescence in the cells. The altered  $F_v/F_0$  ratio suggest that the deprivation of PG from thylakoid membranes result in dramatic decrease of PSII activity which could not be detected by using oxygen electrode because of the inhibition of PSII by quinones.

To localize the site of electron transport within PSII, wich is affected in the *pgsA* mutant, thermoluminescence measurments were used. These data also suggest that PG molecules maintain the membrane organization and thus maintenance of the electron transport,  $Q_A$  to  $Q_B$  in PSII. On the base of these results we could conclude that PG molecules play an important role in the formation of the functionally active achitecture of PSII reaction center and support the efficient electron transfer.

In summary, we showed that PG was required for growth and that PSII activity, but not PSI activity.



## A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS KÖZLEMÉNYEK

*(A dolgozatban felhasznált cikkeket \*-al jelöltem.)*

- M. Debreczeny, Z. Gombos, V. Csizmadia, **Zs. Várkonyi**, B. Szalontai  
Chromophore conformational analysis in phycocyanin and in related  
chromopeptides by surface enhanced Raman spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res.  
Comm.* 159, 1227-1232, **1989**. (IF: 2,872)
- \* Z. Gombos, H. Wada, **Zs. Várkonyi**, D. A. Los, N. Murata  
Characterization of the Fad 12 mutants of *Synechocystis* PCC 6803 that is defective  
in A12 acyl lipid desaturase activity.  
*Biochem. Biophys. Acta* 1299: pp117-124. **1996** (IF: 2.478)
- \* **Várkonyi Zs.**, Zsiros O., and Gombos Z  
The Application of Genetically Manipulated Cyanobacterial Strains in the Study of  
Glycerolipid Unsaturation of Photosynthetic Membranes in the Tolerance of  
Photosynthetic Machinery to Temperature stresses  
*Journal of Scientific and Industrial Research*, 55: pp 658-668, **1996**, (IF: 0.29)
- \* Z. Gombos, Y. Tasaka, O. Zsiros, **Zs. Várkonyi** and N. Murata  
Lipids of Photosynthetic membranes in Cyanobacteria: Roles in protection against  
low-temperature stress  
The Phototrophic Prokaryotes, pp 647-655. **1999**, (Ed.: G. Peschek) Plenum Publ.  
Cooperation,
- Zsiros O., **Várkonyi, Zs.**, Mustárdy, L., Ughy, B., Gombos, Z.,  
Light is necessary in the acclimation process of photosynthetic organism to low-  
temperature stress  
*Advances in Plant Lipid Research*, pp122-124, **1998** (Eds: Sánchez, J., Cerdá-  
Olmedo, E., and Martinez-Force, E.), Universidad de Sevilla, Spain
- \* Gombos, Z., Kis, M., Zsiros O., Ughy, B., **Várkonyi, Zs.**, Wada, H., Tasaka, Y.,  
Farkas, T., and Murata, N.  
Light induction of lipid desaturation: Its role in acclimation to low temperature  
*Advances in Plant Lipid Research*, pp118-121, **1998** (Eds: Sánchez, J., Cerdá-  
Olmedo, E., and Martinez-Force, E.), Universidad de Sevilla, Spain
- \* **Várkonyi Zs.**, Zsiros O., Farkas T., Garab G., Ughy B., Szegeletes Zs., Gombos Z.  
Adaptation mechanism of the photosynthetic apparatus of *Cylindrospermopsis*  
*raciborskii* ACT 9502 to different environmental effects.  
*Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, pp 1819-1822, **1998**, (Ed.: G. Garab)  
Kluwer Acad. Publ, Dordrecht

Gombos Z., Kis M., Zsiros O., Ughy B., **Várkonyi Zs.**, Wada H., Farkas T., Nagy F.

Light induction of lipid desaturation and its role in acclimation to low temperature. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, pp 1783-1786, **1998**, (Ed.: G. Garab) Kluwer Acad. Publ, Dordrecht

- \* M. Hagio, Z. Gombos, **Zs. Várkonyi**, K. Masamoto, N. Sato, M. Tsuzuki and H. Wada  
Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis  
*Plant. Physiology*, **2000**, Vol. 124. pp. 795-804, (IF: 4.434)
  
- \* **Zsuzsanna Várkonyi**, Ottó Zsiros, Tibor Farkas, Győző Garab and Zoltán Gombos  
The tolerance of cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, to low-temperature photoinhibition affected by the induction of polyunsaturated fatty-acid synthesis  
*Biochemical Society Transactions*, *Edited by J. Harwood*, **2000**, Vol: 28, part 6, pp 894-897 (in print) (IF: 0.964)
  
- \* **Zsuzsanna Várkonyi**, Ottó Zsiros, Attila Kovács, Tibor Farkas, Zoltán Gombos and Győző Garab  
Induction of polyunsaturated fatty-acid synthesis enhances the tolerance of a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, to low-temperature photoinhibition  
*Indian Journal of Biochemistry & Biophysics on "Photosynthesis Research in Post-genomic Era"* **2000**, in press (IF: 0.430)
  
- \* Zoltán Gombos, **Zsuzsanna Várkonyi**, Miki Hagio, Masayo Iwaki, László Kovács, Kazamori Masamoto, Shigeru Itoh, Hajime Wada  
Phosphatidylglycerol has a determinative role in the maintenance of the function of photosystem II (in manuscript)

Egyéb nyomtatásban megjelent közlemények, absztraktok

Z. Gombos, H. Wada, **Zs. Várkonyi**, N. Murata  
Changes in membrane constituents by mutation of the gene for fatty acid desaturase in the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803.  
Proceedings of the Annual Meeting and 30th Symposium, Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo, pp293, 1990

**Várkonyi, Zs.**, Zsiros O., Kovács, A.  
Physiological characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* ACT 9502 isolated from the shallow lake Balaton, Hungary (1997) Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Vienna, Austria, pp190, 1997

Garab Gy, **Várkonyi Zs.** Jávorfí T.  
A Balaton vizében található legfontosabb kékalga fajok fotoszintézisének jellemzése  
A Balaton kutatásának 1997-es eredménye, Kiadó: MTA Veszprémi Területi Bizottsága és a Miniszterelnöki Hivatal Balatoni Titkársága, Veszprém, 60-63 oldal, 1998

**Felhasznált irodalom**

- Anton-Erxleben, F. & Langer, H. (1987) *Eur.J.Cell Biol.*, **45**: 102-106.
- Arnon, D. I. (1949) *Plant Physiol.*, **24**: 1-15.
- Aro, E.-M., Virgin, I., & Andersson, B. (1993) *Biochim.Biophys.Acta*, **1143**: 113-134.
- Aro, E.-M., Hundal, T., Carlberg, I., & Andersson, B. (1990) *Biochim.Biophys.Acta*, **1019**: 269-275.
- Bauernfeind, J. C. (1981) *Carotenoids as Colorants and Vitamin A precursors*, Academic Press, London.
- Berglund, A. H., Nilsson, R., & Liljenberg, C. (1999) *Plant Physiol.Biochem.*, **37**: 179-186.
- Bishop, D. G. (1986) *Plant Cell Environ.*, **9**: 613-616.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959) *J.Biochem.Physiol*, **37**: 911-917.
- Bone, R. A. & Landrum, J. T. (1984) *Vision Res.*, **2**: 103-108.
- Bone, R. A., Landrum, J. T., & Cains, A. (1992) *Vision Res.*, **32**: 105-110.
- Breton, J. & Kato, S. (1987) *Biochim.Biophys.Acta*, **892**: 99-107.
- Bryant, D. A. (1994) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Advances in Photosynthesis, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Buckley, C. E. & Houghton, J. A. (1976) *Arch.Microbiol.*, **107**: 93-97.
- Cogdell, R. & Gardiner, A. T. (1993) *Methods Enzymol.*, **214**: 185-193.
- Cooper, P. & Ort, D. R. (1988) *Plant Physiol.*, **88**: 454-461.
- De Las Rivas, J., Telfer, A., & Barber, J. (1993) *Biochim Biophys Acta*, **1142**: 155-164.
- Demeter, S., Goussias, Ch., Bernáth, G., Kovács, L. & Petrouleas, V. (1993) *FEBS Lett.*, **336**: 352-356.
- Demeter, S. & Vass, I. (1984) *Biochim.Biophys.Acta*, **764**: 24-32.
- Demmig-Adams, B. (1990) *Biochim.Biophys.Acta*, **1020**: 1-24.
- Demmig-Adams, B. & Adams, W. W. (1992) *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.*, **43**: 599-626.
- Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I., & Benning, C. (1995) *Plant Cell*, **7**: 1801-1810.



- Ermakova-Gerdes, S. & Vermaas, W. (1998) *Biochemistry*, **37**: 11569-11578.
- Fischer, W., Heinz, E., & Zeus, M. (1973) *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, **354**: 1115-1123.
- Fodor, E. (2000) Ph. D. Thesis, Szeged
- Fujimori, E. & Livingstone, R. (1957) *Nature*, **180**: 1036-1042.
- Golbeck, J. H. (1994) in *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D. A. ed) Chapter 10 Photosystem I in cyanobacteria pp. 319-360.
- Gombos, Z., Kis, M., Páli, T., & Vigh, L. (1987) *Eur.J.Biochem.*, **165**: 461-465.
- Gombos, Z., Tasaka, Y., Zsiros, O., Várkonyi, Zs., & Murata, N. (1999) in *The Phototrophic Prokaryotes* (Peschek, G. eds) pp. 647-655, Plenum Publ. Cooperation,
- Gombos, Z., Várkonyi, Zs., Hagio, M., Iwaki, M., Kovács, L., Masamoto, K., Itoh, S., & Wada, H. (2000) in manuscript
- Gombos, Z., Wada, H., & Murata, N. (1991) *Plant Cell Physiol.*, **32**: 205-211.
- Gombos, Z., Wada, H., & Murata, N. (1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**: 9959-9963.
- Gombos, Z., Wada, H., & Murata, N. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **91**: 8787-8791.
- Gombos, Z., Wada, H., Várkonyi, Zs., Los, D. A., & Murata, N. (1996) *Biochem.Biophys.Acta* 1299: 117-124.
- Goodwin, T. W. (1980) *The Biochemistry of Carotenoids*, Vol.1, 2<sup>nd</sup> Ed Chapman & Hall New York.
- Goodwin, T. W. (1993) *Methods Enzymol.*, **214**: 330-340.
- Goodwin, T. W. & Britton, G. (1988) in *Plant Pigments* (Goodwin, T. W. eds) Distribution and analysis of carotenoids pp. 62-132.
- Greer, D. H., Ottander, C., & Öquist, G. (1991) *Physiol.Pantarum*, **81**: 203-210.
- Gruszczyk, W. I. (1999) in *Photochemistry of Carotenoids Biological Applications* (Frank, H. A., Cogdell, R., Toungh, A., & Britton, G. eds) Carotenoids in Membrane, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht
- Guy, C. L., Niemi, K. J., & Brambl, R. (1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **82**: 3673-3677.
- Güler, S., Seeliger, A., Härtel, H., Renger, G., & Benning, C. (1996) *J.Biol.Chem.*, **271**: 7501-7507.
- Hager, A. & Holocher, K. (1994) *Planta*, **192**: 581-589.

- Hager, A. & Meyer-Bertenrath, T. (1966) *Planta*, **69**: 198-217.
- Hagio, M., Gombos, Z., Várkonyi, Zs., Masamoto, K., Sato, N., Tsuzuki, H., & Wada, H. (2000) *Plant Physiol.*, **124**: 795-804.
- Hankamer, B. & Barber, J. (1997) *Annu.Rev.Plant Mol.Biol.*, **48**: 641-671.
- Havaux, M. (1998) *Trends in Plant Science*, **3** : 147-151.
- Havaux, M. & Niyogi, K. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**: 8762-8767.
- Hawkins, P. R., Runnegar, M. T., Jackson, A. R. B., & Falconer, I. R. (1985) *Applied and Env.Microbiol.*, **50**: 1292-1295.
- Hertzberg, S. & Liaaen-Jensen, S. (1971) *Phytochem.*, **10**: 3121-3127.
- Hideg, É. (1997) in *Handbook of Photosynthesis* (Pessarakli M. ed) pp. 911-931.
- Horváth, I., Török, Z., Vigh, L., & Kates, M. (1991) *Biochim.Biophys.Acta*, **1085**: 126-130.
- Huang, L. & Haug, A. (1974) *Biochim.Biophys.Acta*, **352**: 361-370.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, Y., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., & Tabata, S. (1996) *DNA Res*, **3**: 109-136.
- Kanervo, E., Tasaka, Y., Murata, N., & Aro, E.-M. (1997) *Plant Physiol.*, **114**: 841-849.
- Kenyon, C. N. (1972) *J.Bacteriol.*, **109**: 827-834.
- Kenyon, C. N., Rippka, R., & Stainer, R. Y. (1972) *Arch.Microbiol.*, **83**: 216-236.
- Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G. H., & Barber, J. (1994) *J.Biol.Chem.*, **275**: 6509-6514.
- Los, D. A., Horváth, I., Vigh, L., & Murata, N. (1993) *FEBS Lett.*, **318**: 57-60.
- Lundell, D. J., Glazer, A. N., Melis, A., & Malkin, R. (1985) *J.Biol.Chem.*, **260**: 646-654.
- Lyons, J. M. (1973) *Ann.Rev.Plant Physiol.*, **24**: 445-466.
- Martin, W., Sommerwille, C. C., & Loiseaux-deGöer, S. (1992) *J.Mol.Evol.*, **35**: 385-404.
- Masamoto, K., Zsiros, O., & Gombos, Z. (1999) *J.Plant Physiol.*, **155**: 136-138.
- McCauley, S. W. & Melis, A. (1986) *Photosynth.Res.*, **8**: 3-16.
- Mereschowsky, C. (1910) *Biol.Centr.*, **30**: 353-367.



- Mohapatra, S. S., Poole, R. J., & Dhindsa, R. S. (1987) *Ann.Rev.Plant Physiol.*, **24**: 445-466.
- Murata, N. (1983) *Plant Cell Physiol.*, **24**: 81-86.
- Murata, N. & Omata, T. (1988) in *Methods in Enzymology* (Pecker, L. & Glaser, A. N. eds) Isolation of cyanobacterial membranes pp. 245-251.
- Murata, N., Sato, N., Takahashi, N., & Hamazaki, Y. (1982) *Plant Cell Physiol.*, **23**: 1071-1079.
- Murata, N., Wada, H., & Gombos, Z. (1992) *Plant Cell Physiol.*, **33**: 933-941.
- Murata, N., Wada, H., & Hirasawa, R. (1984) *Plant Cell Physiol.*, **25**: 1027-1032.
- Nanba, O. & Satoh, K. (1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **84**: 109-112.
- Newell, L. W., Amerongen, H., Barber, J., & van Grondelle, R. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1057**: 232-238.
- Omata, T. & Murata, N. (1983) *Plant Cell Physiol.*, **24**: 101-112.
- Omata, T. & Murata, N. (1984) *Arch.Microbiol.*, **139**: 113-116.
- Ono, T. A. & Murata, N. (1981) *Plant Physiol.*, **67**: 176-181.
- Oren, A., Fattom, A., Padan, E., & Tietz, A. (1985) *Arch.Microbiol.*, **141**: 138-142.
- Öquist, G., Greer, D. H., & Ögren, E. (1987) in *Light stress at low temperature* (Kyle D.J., Osmond, C. B., & Arntzen, C. J. eds) *Photoinhibition* pp. 67-87.
- Padisák, J. (1997) *Arch.Microbiol.*, **107**: 563-593.
- Palozza, P. & Krinsky, N. I. (1992) *Methods Enzymol.*, **213**: 403-420.
- Paulsen, H., Rümmler, U., & Rudiger, W. (1990) *Planta*, **181**: 204-211.
- Plumley, F. G. & Schmidt, G. W. (1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **84**: 146-152.
- Raison, J. K. (1973) *J.Bioener.*, **4**: 258-309.
- Saker, M. L., Neilan, B. A., & Griffiths, D. J. (1999) *J.Phycol.*, **35**: 599-606.
- Sandmann, G., Kuhn, M., & Böger, P. (1993) *Photosynth.Res.*, **35**: 185-190.
- Sato, N. & Murata, N. (1980) *Biochim.Biophys.Acta*, **619**: 353-366.
- Sato, N. & Murata, N. (1982) *Biochim.Biophys.Acta*, **710**: 271-278.
- Satoh, K. (1992) in *Research in Photosynthesis* (Murata, N. eds) *Structure and Function of Photosystem II Reaction Center* pp. 3-12.
- Schreiber, U., Endo, T., Mi, H. & Asada, K. (1995) *Plant Cell Physiol.* **36(5)**: 873-882.

- Schreiber, U., Klughammer, C., & Neubauer, C. (1988) *Z.Naturforsch.*, **43**: 686-698.
- Schrimper, A. F. W. (1883) *Bot.Zeit.*, **41**: 105-114.
- Seenaya, G. & Subba, R. N. (1972) in *Taxonomy and biology of blue-green algae* (Desikachary, T. V. eds) pp. 52-57.
- Siegenthaler, P.-A. (1998) in *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* Chapter 7: Molecular Organization of Acyl Lipids in Photosynthetic Membranes of Higher Plants (Siegenthaler, P.-A. & Murata N. eds) pp. 119-144.
- Sommer, T. R., Potts, W. T., & Morrissey, N. M. (1990) *Hydrobiologia*, **204/205**: 435-443.
- Stainer, R. Y. & Cohen-Bazire, G. (1977) *Annu.Rev.Microbiol.*, **31**: 225-274.
- Stransky, H. & Hager, A. (1970) *Arch.Microbiol.*, **72**: 84-96.
- Suzuki, R. & Fujita, Y. (1977) *Plant Cell Physiol.*, **18**: 625-631.
- Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K., & Murata, N. (1996) *EMBO J.*, **15**: 6416-6425.
- Tasaka, Y., Nishida, I., Higashi, S., Beppu, T., & Murata, N. (1990) *Plant Cell Physiol.*, **31**: 545-550.
- Thompson, G. A. J. (1980) in *The regulation of membrane lipid metabolism The effect of environmental factors on lipid metabolism* pp. 171-196.
- Tuveson, R. W. & Sandmann, G. (1993) *Methods Enzymol.*, **214**: 323-330.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuonemi, A., Aro, E.-M., & Andersson, B. (1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**: 1408-1412.
- Várkonyi, Zs., Zsiros, O., Farkas, T., Garab, G., & Gombos, Z. (2000) *Biochem.Society Trans.* **28**: 894-897.
- Várkonyi, Zs., Zsiros, O., Farkas, T., Garab, G., Ughy, B., Szegletes, Zs., & Gombos, Z. (1998) in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab, G. ed) pp. 1819-1822, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- Várkonyi, Zs., Zsiros, O., & Gombos, Z. (1996) *J.Scientific & Industrial Res.*, **55**: 658-668.
- Várkonyi, Zs.\* , Zsiros, O., Kovács, A., Farkas, T., Gombos, Z., & Garab, G. (2000) *Indian J.Biochem.&Biophys.* on "Photosynthesis Research in Postgenomic Era" (in press)

Wada, H. & Murata, N. (1990) Plant Physiol., **92**: 1062-1069.

Woloszynska, J. (1912) Bull. Int. Acad.Sci.Cracoviae., Ser. B, **6**: 649-709.

Yamamoto, H. Y. (1979) Pure Appl.Chem., **51**: 639-648.

Yurkov, V., Gad'on, N., & Drews, G. (1993) Arch.Microbiol., **160**: 372-376.

## KÖSZÖNET

Ezúton szeretnék köszönetet mondani az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézet volt és jelenlegi igazgatójának, Dr. Dudits Dénes akadémikusnak és Dr. Vass Imrének.

A munkát 1995 és 1998 között a Miniszterelnöki Hivatal Balatoni Titkársága által kiírt pályázat támogatásával végeztem.

Külön köszönettel tartozom Dr. Garab Győzőnek, a Tilakoid Membrán Energizációs Csoport vezetőjének, aki a fenti kutatás tárgyi feltételeit megteremtette és lehetővé tette számomra, hogy ebben a munkában részt vegyek. Köszönöm neki, hogy nem csak szakmailag, de magánemberként is segített tanácsaival, biztatásával, ha csüggedtem és a "feladásra" gondoltam. Végül köszönöm a dolgozat többszöri, gondos átolvasását és tanácsait.

Köszönöm Dr. Mustárdy Lászlónak és Jávorfai Tamásnak a baráti tanácsokat és segítséget, Kovács Lászlónak az együtt végzett méréseket, amit reményeim szerint a jövőben is folytatni fogunk.

Külön öröm számomra, hogy együtt dolgozhatok olyan emberekkel, mint Szalmáné Katona Gyöngyvér és Kunné Sallai Anna, akiknek a segítsége pótolhatatlan lenne.

Hálás vagyok és köszönöm Zsiros Ottónak azt a sok gyakorlati munkában nyújtott segítséget, ami nélkül ez a dolgozat nem íródott volna meg.

Külföldön végzett munkám feltételeinek biztosításaért köszönettel tartozom Prof. Norio Muratának, Dr. Hajime Wadának és Prof. Christian Wilhelmnek, akiknek a csoportjában dolgozhattam.

Ez a munka nem jött volna létre Dr. Gombos Zoltán nélkül. Szakmai témavezetőm volt, a kísérleteket az ő tanácsai alapján terveztük és kivitelezte. Ő tette lehetővé, hogy három gyermekünk mellett nem kellett a kutatómunkáról sem lemondanom. Köszönöm a türelmét, a kitartását és minden téren nyújtott segítségét.